

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANE CARLOTTO

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE FOLHAS DE *Arctium lappa*

CURITIBA  
2013

JULIANE CARLOTTO

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE FOLHAS DE *Arctium lappa*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Co-orientador: Dr. Lauro Mera de Souza

CURITIBA  
2013

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Carlotto, Juliane

Estudo químico e biológico de folhas de *Arctium lappa*. / Juliane Carlotto. – Curitiba, 2013.  
104f.: il. ; 30cm.

Orientador: Thales Ricardo Cipriani

Co-orientador: Lauro Mera de Souza

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Polissacarídeos . 2. Bardana . 3. Arctium . I. Título II. Cipriani, Thales Ricardo. III. Souza, Lauro Mera de. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

## TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANE CARLOTTO

### ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE FOLHAS DE *Arctium lappa*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências-Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucimara Mach Côrtes Cordeiro

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof. Dr. Andersson Barison

Depto. de Química - UFPR

Curitiba, 27 de fevereiro de 2013

Dedico esse trabalho  
a meus grandes incentivadores:  
meu noivo Joilson e  
meus pais Irineu e Sandra.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para realização deste trabalho, especialmente:

A Deus, por ter iluminado o meu caminho;

Ao professor Dr. Thales Cipriani, não apenas pela orientação deste trabalho, mas por tê-la realizado de forma tão solícita, atenciosa e acessível. Sou grata por todos os ensinamentos na área de química de carboidratos e pela disponibilidade durante toda realização deste trabalho. Foi um grande prazer tê-lo como orientador!

Ao Dr. Lauro Mera de Souza, pela orientação e grande auxílio na execução das análises referentes aos metabólitos secundários. Obrigada pela paciência, ensinamentos, disponibilidade e por tantas horas despendidas em frente ao UHPLC-MS;

Às professoras Dra. Cristiane Baggio e Dra. Maria Fernanda Werner e às alunas Luísa Mota da Silva e Daniele Maria Ferreira, pela realização dos ensaios biológicos;

Aos professores Dr. Andersson Barison e Dra. Lucimara Cordeiro, por terem aceitado o convite para a banca examinadora deste trabalho;

Aos demais professores do grupo de pesquisa: Dr. Marcello Iacomini, Dr. Guilherme Sasaki, Dra. Lucimara Cordeiro e Dr. Philip Gorin, o amor de vocês à pesquisa é inspirador!

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki e ao Arquimedes, pela realização das análises de RMN e pelas inúmeras dúvidas esclarecidas.

À Rosane e Eliz, pelas análises de GC-MS e HPSEC-MALLS.

Aos queridos colegas dos laboratórios E1, 247 e 252: Geórgia, Thaísa, Elaine, Larry, Nessana, Adamara, Andréia, Alex, Ana Helena, Yanna, Carol, Aramis, Simone, Aline, Nadi, Fernanda, Camila, Popó, Fhernanda, Rhayla, Vassoler e Arquimedes. Agradeço pelos inúmeros auxílios nos experimentos e pela agradável convivência no laboratório. Agradeço de modo especial à Geórgia, Thaísa, Larry, Adamara, Nessana e Camila, por todo o auxílio prestado, especialmente nos momentos em que eu estive ausente do laboratório.

Ao meu noivo Joilson, o maior incentivador para realização deste trabalho. Agradeço pela compreensão nos momentos em que eu não pude estar presente, e

por estar presente em todos os momentos que eu precisei. As minhas vitórias são suas vitórias!

Aos meus pais Irineu e Sandra, os melhores pais do mundo. Sou grata pelo amor e apoio incondicionais, e também pela melhor herança que poderiam ter deixado: o incentivo aos estudos.

Aos meus irmãos Irineu Junior e Giuliano, agradeço por todos os momentos compartilhados. A chegada de vocês a este mundo tornou a minha existência mais feliz!

Aos meus nonos Bernardete e Edemir, exemplos de generosidade, honradez e amor incondicional.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, pela oportunidade de realização deste trabalho de Mestrado.

Ao CNPq, CAPES, FINEP e Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein



## RESUMO

*Arctium lappa*, conhecida popularmente como bardana, é uma planta medicinal originária do Japão e aclimatada no Brasil. Ela é utilizada na medicina popular para tratamento de infecções, inflamações, febre, problemas crônicos de pele, gota, cálculo renal, úlcera gástrica, queimaduras e outras enfermidades. Este trabalho apresenta a extração, purificação, caracterização estrutural e avaliação da atividade gastroprotetora e anti-inflamatória de polissacarídeos das folhas de *A. lappa*. Além disso, mostra o fracionamento bioguiado por atividade antiúlcera gástrica dos compostos de baixa massa molar. De maneira geral, as frações polissacarídicas apresentaram-se constituídas majoritariamente pelos monossacarídeos Rha, Ara, Glc, Gal e GalA e, de acordo com análises de RMN e metilação, são compostas por dois polissacarídeos principais: ramnogalacturonana tipo I (RG I) e arabinogalactana tipo II (AG II). Polissacarídicas de *A. lappa* apresentaram atividade anti-inflamatória, mas não apresentaram nenhum efeito gastroprotetor. A fração contendo compostos de baixa massa molar (fração FSE) apresentou-se composta principalmente por ácidos fenólicos, entre os quais os ácidos 1-O-cafeoilquínico, neo-clorogênico, clorogênico, *crypto*-clorogênico, 1,3-O-dicafeoilquínico, 3,4-O-dicafeoilquínico, 3,5-O-dicafeoilquínico e 4,5-O-dicafeoilquínico, além dos flavonóides rutina e quercetina-ramnosídeo. Esta fração apresentou atividade antiúlcera gástrica de maneira dose dependente. O processo de fracionamento bioguiado de FSE gerou uma única fração com efeito antiúlcera gástrica, a fração FSE-AE, composta principalmente por ácidos dicafeoilquínicos.

Palavras-chave: *Arctium lappa*; Polissacarídeos; Ácidos clorogênicos; Atividades biológicas.

## ABSTRACT

*Arctium lappa*, popularly known as burdock, is a medicinal plant brought from Japan and acclimated in Brazil. It is used in folk medicine for treatment of infection, inflammation, fever, chronic skin problems, gout, kidney stones, gastric ulcers, burns and other diseases. This study presents the extraction, purification, structural characterization and evaluation of gastroprotective and anti-inflammatory activities of polysaccharides of *A. lappa* leaves. Furthermore, it shows the fractionation guided by anti-ulcer activity of low molar mass compounds. In general, the polysaccharide fractions showed mainly Rha, Ara, Gal, Glc e GalA on the monosaccharide composition analysis and, according to NMR and methylation analysis, they are composed of two main polysaccharides: type I rhamnogalacturonan (RG I) and type II arabinogalactan (AG II). Polysaccharide fractions of *A. lappa* showed anti-inflammatory activity, but did not demonstrate gastroprotective effect. The fraction containing compounds of low molar mass (FSE) showed mainly phenolic acids in its composition, among these 1-*O*-caffeoylquinic, *neo*-chlorogenic, chlorogenic, *crypto*-chlorogenic, 1,3-*O*-dicaffeoylquinic, 3,4-*O*-dicaffeoylquinic, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acids and also the flavonoids rutin and quercetin-rhamnoside. This fraction showed anti-ulcer activity in a dose-dependent manner. Bioguided fractionation of FSE gave a single fraction with gastric anti-ulcer activity, the fraction FSE-AE, composed mainly of dicaffeoylquinic acids.

Keywords: *Arctium lappa*; Polysaccharides; Chlorogenic acids; Biological activities.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Arctium lappa</i> .....	21
FIGURA 2 – ESTRUTURAS DAS PRINCIPAIS LIGNANAS IDENTIFICADAS EM <i>A. lappa</i> . ....	27
FIGURA 3 – ESTRUTURAS DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EM <i>A. lappa</i> . ....	29
FIGURA 4 – ESTRUTURAS DOS PRINCIPAIS FLAVONÓIDES IDENTIFICADOS EM <i>A. lappa</i> .....	30
FIGURA 5 – MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I (CARPITA E GIBEAUT, 1993). ....	33
FIGURA 6 – ESTRUTURA BÁSICA DE RAMNOGALACTURONANA TIPO I (RGI) COM CADEIAS LATERAIS DE (1→4)-β-D-GALACTANA, (1→5)-α-L-ARABINANA E ARABINOGLATANA TIPO I (AGI) (CARPITA E MCCANN, 2000). ....	35
FIGURA 7 – ESTRUTURA DAS ARABINOGLACTANAS TIPO II (CARPITA e GIBEAUT, 1993). ....	36
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO AQUOSA E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS. ....	54
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO ALCALINA E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS. ....	55
FIGURA 10 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES ASGD E BSGD, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID). ....	56
FIGURA 11 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES ASAA E BSAA, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID). ....	57
FIGURA 12 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES ARF50, ARF30 E AEF30, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID). ....	58
FIGURA 13 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES BRF30 E BEF30, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID). ....	59
FIGURA 14 – TLC DAS AMOSTRAS ASGD, APGD, BSGD E BPGD APÓS HIDRÓLISE (TFA 2 M, 8 h A 100 °C). ....	61
FIGURA 15 – ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES ASAA e BSAA. ....	63
FIGURA 16 – MAPAS DE CORRELAÇÃO DIRETA <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H (HSQC) DAS FRAÇÕES ARF30 E BRF30. ....	67

FIGURA 17 – EFEITO DA FRAÇÃO ASAA (0,3, 3 e 30 mg/kg, v.o.) NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.....	69
FIGURA 18 – EFEITO DA FRAÇÃO ASAA (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.) NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA. A) EXPERIMENTO MONITORADO POR ATÉ 72 h E B) RESULTADOS OBTIDOS APÓS 4 HORAS.....	71
FIGURA 19 – EFEITO DAS FRAÇÕES ARF50 (7,7 mg/kg, i.p.), ARF30 (4,9 mg/kg, i.p.) E AEF30 (18,4 mg/kg, i.p.) NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	71
FIGURA 20 – ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO OFFLINE POSITIVO (A) E NEGATIVO (B) DA FRAÇÃO FSE.....	73
FIGURA 21 – ESTRUTURA DOS ÁCIDOS MONOCAFEILOILQUÍNICOS E DICAFEILOILQUÍNICOS.....	73
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA UHPLC-PDA (325 nm) DA FRAÇÃO FSE COM INSERTO DO ESPECTRO DE UV NA FAIXA DE 200 A 400 nm (A) E CROMATOGRAMA DA AMOSTRA REFERÊNCIA DE <i>Ilex paraguariensis</i> (B).....	75
FIGURA 23 – ESQUEMA DE FRAGMENTAÇÃO DE UM ÁCIDO MONOCAFEILOILQUÍNICO.....	76
FIGURA 24 – ESPECTROS DE MASSA EM MODO NEGATIVO DO PICO 2 (A), PICO 4 (B), PICO 5 (C), PICO 10 (D), PICO 12 (E) E PICO 15 (F). ....	77
FIGURA 25 – EFEITO DA FRAÇÃO FSE (1, 10 e 100 mg/kg, v.o.) NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.....	80
FIGURA 26 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLAR OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE <i>A. lappa</i> .....	81
FIGURA 27 – EFEITO DAS FRAÇÕES FSE-C (0,01 mg/kg, v.o.), FSE-AE (0,15 mg/kg, V.O.), FSE-B (0,30 mg/kg, v.o.) E FSE-AQ (1,99 mg/kg, v.o.) NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.....	82
FIGURA 28 – COMPARAÇÃO POR UHPLC-PDA (325 nm) ENTRE AS FRAÇÕES FSE (A), FSE-AE (B) E FSE-B (C).....	84
FIGURA 29 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR GC-MS DAS FRAÇÕES FSE-AE (A) E FSE-B (B) APÓS METANÓLISE E ACETILAÇÃO. FRAGMENTAÇÃO POR IONIZAÇÃO POR ELÉTRONS (70 eV) DO PICO 1 (ÁCIDO QUÍNICO) (C) E DO PICO 2 (ÁCIDO CAFÉICO) (D) DERIVATIZADOS. ....	85
FIGURA 30 – ETRUTURA DO ÁCIDO QUÍNICO.....	86

FIGURA 31 – REAÇÃO DE ACETALAÇÃO COM FORMAÇÃO DE DERIVADO 4,5-O-ISOPROPILIDENO.....	87
FIGURA 32 – CROMATOGRAMA UHPLC-PDA (325 nm) DO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO APÓS REAÇÃO DE ACETALAÇÃO (A) E ESPECTRO DE MASSAS DO DERIVADO 4,5-O-ISOPROPILIDENO (B).....	87
FIGURA 33 – CROMATOGRAMAS UHPLC-PDA (325 nm) DAS FRAÇÕES FSE-AE NATIVA (A) E FSE-AE APÓS REAÇÃO DE ACETALAÇÃO (B).....	88
FIGURA 34 – ESPECTRO DE MASSAS DO DERIVADO 4,5-O-ISOPROPILIDENO-3-O-CAFEOILQUÍNICO E SEU RESPECTIVO ESQUEMA DE FRAGMENTAÇÃO.....	89
FIGURA 35 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ (HSQC) (A) E INSERTO COM FRAGMENTO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (COSY) (B) DO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	92
FIGURA 36 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ (HSQC) E INSERTO COM FRAGMENTO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (COSY) (B) DA FRAÇÃO AE-DCQ. ....	93

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DERIVADAS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA DE <i>A. lappa</i> . .....	59
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA DAS FOLHAS DE <i>A. lappa</i> .....	60
TABELA 3 – ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE BRF30, BEF30, ARF50, ARF30 E AEF30. ....	65
TABELA 4 – UHPLC-PDA-MS EM MODO NEGATIVO DOS COMPONENTES PRESENTES NO SOBRENADANTE ETANÓLICO (FSE) DAS FOLHAS DE <i>A. lappa</i> . .....	79
TABELA 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO DOS COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLAR OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE <i>A. lappa</i> .....	81

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE <i>A. lappa</i> .....	21
2.2 USOS POPULARES DE <i>A. lappa</i> .....	22
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>A. lappa</i> .....	22
2.3.1 Atividade anti-inflamatória .....	22
2.3.2 Atividade antiúlcera .....	23
2.3.3 Atividade antimicrobiana e antiviral .....	24
2.3.4 Atividade antitumoral .....	24
2.3.5 Atividade antidiabética .....	25
2.4 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DE <i>A. lappa</i> .....	25
2.6 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	26
2.6.1 Compostos fenólicos identificados em <i>A. lappa</i> .....	26
2.6.2 Terpenóides identificados em <i>A. lappa</i> .....	30
2.5 CARBOIDRATOS DE PLANTAS .....	31
2.5.1 Parede celular .....	32
2.5.2 Pectinas .....	33
2.5.3 Hemiceluloses .....	36
2.5.4 Atividade anti-inflamatória promovida por polissacarídeos .....	37
2.5.5 Atividade antiúlcera gástrica promovida por polissacarídeos .....	38
3 OBJETIVOS .....	40
3.1 OBJETIVO GERAL .....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
4.1 MATERIAL BOTÂNICO .....	41
4.2 DESLIPIDIFICAÇÃO E DESPIGMENTAÇÃO DO MATERIAL DE ESTUDO .....	41
4.3 OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA .....	41
4.4 OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS POR EXTRAÇÃO ALCALINA .....	41
4.5 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS .....	42
4.5.1 Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo .....	42

4.5.2 Fracionamento dos polissacarídeos por variação do pH do meio .....	42
4.5.3 Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração.....	43
4.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS .....	43
4.6.1 Composição monossacarídica .....	43
4.6.1.1 Hidrólise dos polissacarídeos .....	43
4.6.1.2 Redução e acetilação dos monossacarídeos .....	44
4.6.2 Metilação dos polissacarídeos isolados.....	44
4.6.3 Carboxirredução pelo método de Taylor e Conrad (1972).....	45
4.7 FRACIONAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIÚLCERA GÁSTRICA.....	45
4.8 ANÁLISE ESTRUTURAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	46
4.8.1 Modificação química de ácidos dicafeoilquínicos - acetalação .....	46
4.8.2 Metanólise e acetilação .....	46
4.9 PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO PRESENTE NA FRAÇÃO FSE-AE .....	46
4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	47
4.10.1 Cromatografia em camada delgada (TLC).....	47
4.10.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) .	47
4.10.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) .....	48
4.10.4 ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) .....	49
4.10.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	49
4.10.6 Dosagem de ácidos urônicos pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) .....	49
4.10.7 Teste de homogeneidade e determinação da massa molar .....	50
4.11 ATIVIDADES BIOLÓGICAS PROMOVIDAS PELOS EXTRATOS DE <i>A. lappa</i> .....	51
4.11.1 Atividade antiúlcera gástrica .....	51
4.11.1.1 Animais .....	51
4.11.1.2 Indução de lesão gástrica aguda em ratos .....	51
4.11.2 Atividade anti-inflamatória.....	52
4.11.2.1 Animais .....	52
4.11.2.2 Indução de edema de pata pela injeção intraplantar de carragenina....	52
4.11.3 Análise Estatística.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54



5.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE POLISSACARÍDEOS.....	54
5.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS .....	60
5.2.1 Análises de composição monossacarídica e RMN de $^{13}\text{C}$ .....	60
5.2.2 Análises de metilação e RMN de correlação direta $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ (HSQC) .....	64
5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS PROMOVIDAS PELOS EXTRATOS DE <i>A. lappa</i> .....	68
5.3.1 Atividade antiúlcera gástrica da fração ASAA.....	69
5.4.1 Análise estrutural da fração FSE .....	72
5.4.1.1 Análise por ESI-MS em modo <i>offline</i> .....	72
5.4.1.2 Análise por UHPLC-PDA-ESI-MS.....	73
5.4.2 Atividade antiúlcera da fração FSE .....	79
5.4.3 Fracionamento bioguiado para identificação de compostos com atividade antiúlcera gástrica.....	80
5.4.4 Análise das frações obtidas por partição líquido/líquido .....	82
5.4.5 Purificação e análise do ácido 1,3-O-dicafeoilquínico.....	89
6 CONCLUSÃO.....	94
7 REFERÊNCIAS.....	95

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\delta$	Deslocamento químico
AG I	Arabinogalactana tipo I
AG II	Arabinogalactana tipo II
Ara	Arabinose
Carbodiimida	Ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida
CH <sub>3</sub> I	Iodeto de metila
COSY	Correlation Spectroscopy
D <sub>2</sub> O	Óxido de deutério
DE <sub>50</sub>	Dose efetiva 50%
DEPT-135	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dn/dc	Taxa de variação do índice de refração com relação à concentração
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
eV	Elétron-volt
<i>f</i>	Furanosídico
Gal	Galactose
GalA	Ácido galacturônico
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Glc	Glucose
HPSEC	Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i>
i.p.	Intraperitoneal
<i>m/z</i>	Razão massa por carga
KOH	Hidróxido de potássio
Man	Manose
Me	Grupamento metil (CH <sub>3</sub> )
MES	Ácido etanosulfônico-2-[N-morfolina]
NaBD <sub>4</sub>	Boroidreto de sódio deuterado

NaBH <sub>4</sub>	Boroidreto de sódio
NaN <sub>3</sub>	Azida
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amônio
<i>p</i>	Piranosídico
PDA	<i>Photodiode array</i>
ppm	Partes por milhão
p/v	Peso por volume
RG I	Ramnogalacturonana tipo I
RG II	Ramnogalacturonana tipo II
Rha	Ramnose
RID	Detector de índice de refração
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
rpm	Rotação por minuto
TFA	Ácido trifluoroacético
tR	Tempo de retenção
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
v.o.	Via oral
v/v	Volume por volume
Xyl	Xilose

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, os produtos naturais têm sido utilizados com sucesso na prevenção e cura de diversos tipos de enfermidades. Entretanto, com a ascensão da indústria farmacêutica no século XX, os fármacos sintéticos triunfaram em detrimento aos extratos naturais no tratamento de doenças (RASKIN *et al.*, 2002).

Todavia, após um longo período de êxito, a medicina convencional demonstrou algumas limitações, como ineficácia terapêutica e dificuldade de desenvolvimento de produtos mais efetivos. Em virtude disso, atualmente existe uma forte tendência do mercado em retornar aos medicamentos oriundos de produtos naturais (RATES, 2001). A indústria pode encontrar na natureza uma fonte inesgotável de novos compostos químicos e, como consequência, promover o desenvolvimento de novos medicamentos.

Considerando a necessidade de identificação da composição fitoquímica dos produtos naturais, este trabalho tem por objetivo promover o estudo dos constituintes químicos das folhas de *Arctium lappa* (*A. lappa*) e de algumas de suas propriedades biológicas.

*Arctium lappa*, conhecida popularmente como bardana, é uma planta medicinal com ampla aplicação na medicina popular. Ela é originária do Japão e está aclimatada no Brasil. Geralmente é consumida na forma de infuso, decocto ou utilizada externamente na forma de emplastro (JEELANI *et al.*, 2010). A bardana é utilizada na medicina popular para tratamento de infecções, inflamações, febre, problemas crônicos de pele, gota, cálculo renal, úlcera gástrica, queimaduras e outras enfermidades (CHEVALIER, 1996; FOSTER *et al.*, 1999). Os extratos de diferentes partes da planta - raízes, folhas, sementes e frutos - possuem aplicações terapêuticas (LIN *et al.*, 2002). Muitas atividades biológicas já foram cientificamente comprovadas para espécies de *Arctium*, incluindo anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética, antimicrobiana, antifúngica (CHAN *et al.*, 2011) e antiúlcera gástrica (SANTOS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013).

No entanto, verifica-se na literatura uma menor prevalência de estudos das folhas em relação às raízes e sementes, apesar das folhas serem ricas em compostos fenólicos (LOU *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos são oriundos do metabolismo secundário da planta e muitos benefícios à saúde estão a eles associados, entre os quais podemos incluir os efeitos antioxidante (SUN *et al.*, 2011;

SILVA *et al.*, 2013), antitumoral (TAMAYO *et al.*, 2000), anti-HIV (SLANINA *et al.*, 2001) e antiúlcera gástrica (SANTOS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013).

Estudos anteriores relataram a presença de diferentes classes de compostos fenólicos nas folhas de bardana, tais como lignanas, ácidos fenólicos e flavonóides. A existência das lignanas arctiina e arctigenina foi verificada por Liu *et al.* (2005). A presença de ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido clorogênico e cinarina) e de flavonóides (rutina, quercitrina, quercetina e luteolina) foi demonstrada por Ferracane *et al.* (2010). Além dos ácidos fenólicos já relatados, Lou *et al.* (2010) mostraram ainda a presença de ácido *o*-hidroxibenzóico e ácido *p*-cumárico. Todavia, não existem informações sobre outros metabólitos secundários em folhas de bardana.

Quando um infuso ou decocto das folhas da planta é consumido, não apenas metabólitos secundários, mas também metabólitos primários são ingeridos e, entre estes últimos estão os polissacarídeos (CIPRIANI, 2007).

Os polissacarídeos formam uma importante classe de compostos naturais bioativos (SIMÕES, 2003). Algumas das atividades biológicas relatadas para estes compostos são: imunomoduladora, antitumoral (JIANG *et al.*, 2010), hipocolesterolêmica (RONDANELLI *et al.*, 2009), antioxidante (NERGARD *et al.*, 2005), anti-inflamatória (CARBONERO *et al.*, 2008) e antiúlcera gástrica (CIPRIANI *et al.*, 2006; CIPRIANI *et al.*, 2008).

Tendo em vista a importância biológica de polissacarídeos e metabólitos secundários, este trabalho tem por objetivo a caracterização estrutural destas classes de compostos em folhas de *A. lappa*. Além disso, considerando que as folhas desta planta são utilizadas terapeuticamente na medicina popular, amostras contendo estes compostos foram testadas para avaliação quanto a duas de suas atividades relatadas: antiúlcera gástrica e anti-inflamatória.

Atividade anti-inflamatória promovida por polissacarídeos de outras fontes naturais já foi demonstrada em estudos anteriores (CARBONERO *et al.*, 2008; SMIDERLE *et al.*, 2008), mas não há relatos na literatura desta atividade relacionada à polissacarídeos de folhas de *A. lappa*, por isso os polissacarídeos oriundos das folhas foram submetidos a ensaio biológico *in vivo* para avaliação deste efeito.

Efeito antiúlcera gástrica já foi demonstrado para o extrato aquoso bruto das folhas desta planta em estudo realizado por CALIXTO *et al.* (2003), mas os compostos responsáveis por este efeito não foram identificados. Desta forma, no

presente trabalho, o extrato aquoso das folhas da planta foi fracionado e tanto as frações contendo polissacarídeos quanto as contendo metabólitos secundários foram submetidas a testes para avaliação de atividade antiúlcera gástrica. O estudo dos metabólitos secundários foi realizado por meio de fracionamento bioquímico, e os possíveis compostos responsáveis por esta atividade foram assim identificados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *A. lappa*

*Arctium lappa* (FIGURA 1) é uma planta herbácea pertencente à família Asteraceae. Ela é uma espécie originária do Japão, onde cresce espontaneamente ao longo de estradas, próxima a córregos, sopé de morros e encostas de pasto nativo. No Brasil, cresce de maneira espontânea nos campos, bosques e áreas rurais. Sua aclimação é tamanha, que a planta é considerada uma espécie invasora (SILVA JUNIOR, 2001).



FIGURA 1 – *Arctium lappa*.

Fonte: <http://www.fitoterapica.com/plantaservas/image/Arctium-lappa.html>

Em território nacional apresenta as seguintes sinonímias: bardana, orelha de gigante, bardana-maior, gobô, carrapicho-grande, pega-massa, erva-dos-tinhosos, pergamasso e outras (SILVA JUNIOR, 2001).

*Arctium lappa* é uma planta robusta, ereta, ramosa e pubescente-cotonosa, que atinge de 50 cm a 2 m de altura. Ela apresenta folhas alternas, pecioladas, as

inferiores cordiformes e as superiores ovaladas (CORRÊA, 1984). As folhas atingem grande porte (40 x 25 cm) antes do florescimento. As flores são rosadas ou púrpuras e estão agrupadas em corimbos frouxos de volumosos capítulos pedunculados, esféricos, espiculosos, rodeados de brácteas verdes, terminadas em ponta (SILVA JUNIOR, 2001). O fruto é um aquênio oblongo-subtrígono e possui papilhos de pelos caducos. As raízes podem chegar a 1,2 m de profundidade e 1 cm de diâmetro. São carnosas, fusiformes, brancas internamente e pardas externamente (FONT QUER, 1988).

## 2.2 USOS POPULARES DE *A. lappa*

*Arctium lappa* tem vasta aplicação na medicina popular. Ela é uma das ervas mais utilizadas como detoxificante pela medicina tradicional chinesa e ocidental. Historicamente tem sido usada como remédio para infecções, inflamações, gota, cálculo renal, úlcera gástrica (CHEVALIER, 1996), e por suas propriedades diuréticas e antipiréticas (CHEN *et al.*, 2004). Também existem relatos de ações da bardana como antidiarréica (SILVA JUNIOR, 2001), digestiva e em doenças dermatológicas, como psoríase (CUNHA *et al.*, 2003), acne, bolhas, abscessos, infecções locais e eczema (CHEVALIER, 1996).

## 2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *A. lappa*

Diversas atividades biológicas e funções farmacológicas são relatadas para *A. lappa*, incluindo anti-inflamatória, antiúlcera gástrica, antitumoral, antidiabética, antimicrobiana e antifúngica (CHAN *et al.*, 2011).

### 2.3.1 Atividade anti-inflamatória

Estudo realizado com lignanas isoladas do extrato metanólico das sementes de bardana demonstrou efeito anti-inflamatório pela inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos ativados por lipopolissacarídeos (LPS) (PARK *et al.*, 2007). O aumento da produção de NO gera aumento da expressão de ciclooxigenase-2, que leva à formação de prostaglandinas, as quais estão associadas com o aparecimento da inflamação. Trabalho realizado por Wang *et al.*



(2007) demonstrou que o extrato metanólico das raízes de bardana apresenta efeito anti-inflamatório pela sua eficácia na inibição dos níveis de expressão do mRNA da COX-2.

A lignana arctigenina (FIGURA 2), isolada do extrato hidroalcoólico das sementes, além de promover a diminuição de produção de NO, exibiu efeito anti-inflamatório por inibir fortemente a expressão das citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6, em células RAW264.7 estimuladas por LPS (ZHAO *et al.*, 2009).

O extrato etanólico da bardana (raízes e folhas) exibiu efeitos anti-inflamatórios por inibir a degranulação e liberação de leucotrienos cisteínicos (Cys-LTS) - que são mediadores inflamatórios - por células mononucleares do sangue periférico (KNIPPING *et al.*, 2008). E estudo realizado por Lin *et al.* (1996) demonstrou características anti-inflamatórias do extrato bruto das raízes de bardana sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina.

### 2.3.2 Atividade antiúlcera

Em estudo realizado por Calixto *et al.* (2003), o extrato aquoso bruto das folhas da bardana foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões agudas induzidas pelo etanol, mas os compostos responsáveis por este efeito não foram identificados.

O extrato clorofórmico das raízes da bardana também apresentou um importante efeito protetor gástrico, causado pela redução da secreção de HCl, via inibição da bomba  $H^+/K^+$  ATPase. O pré-tratamento oral com o extrato clorofórmico reduziu significativamente lesões gástricas induzidas por etanol. A administração oral por sete dias reduziu a ulceração crônica gástrica induzida por ácido acético. O extrato clorofórmico, via intraduodenal e intraperitoneal, reduziu a acidez total da secreção gástrica. E, em estudos *in vitro*, a mesma fração inibiu a atividade da bomba  $H^+/K^+$  ATPase (SANTOS *et al.*, 2009).

O extrato etanólico, obtido das raízes da bardana, também foi avaliado quanto ao mecanismo de gastroproteção. Foi demonstrado que este efeito parece envolver mecanismos antioxidantes e a redução da secreção ácida gástrica. Os principais constituintes deste extrato são uma série de ácidos hidroxicinamoilquínicos, principalmente isômeros dicafeoilquínicos (SILVA *et al.*, 2013).

Além disso, a utilização das raízes como antidiarréico está descrita na 1ª edição do Formulário de Fitoterápicos, um dos componentes da 5ª edição da Farmacopéia Brasileira, a qual disponibiliza formulações de plantas com dados de eficácia e segurança comprovadas na literatura (ANVISA, 2011). Segundo este Formulário, o preparo de *A. lappa* deve ser realizado por decocção, na seguinte proporção: 2,5 g de raízes secas para 150 mL de água.

### 2.3.3 Atividade antimicrobiana e antiviral

Pereira *et al.* (2005) relataram que o extrato liofilizado das folhas de bardana apresenta atividade antimicrobiana contra microrganismos orais e é mais eficaz contra as bactérias relacionadas a patógenos endodônticos, tais como: *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antibacteriana da *A. lappa* foi observada também por Gentil *et al.* (2006), utilizando a fração acetato de etila em infecções intracanal dentário, em cães. Portanto, as folhas de bardana podem ser úteis no tratamento de doenças relacionadas com microrganismos da cavidade oral.

O ácido clorogênico (FIGURA 3), isolado das folhas, mostra efeitos restritivos sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* (LIN *et al.*, 2004). Além disso, poliacetilenos extraídos da raiz de bardana também possuem potente atividade antibacteriana e antifúngica (TAKASUGI *et al.*, 1987).

Componentes fenólicos da bardana, tais como o ácido caféico (FIGURA 3) e ácido clorogênico, também demonstraram atividade antiviral sobre herpes vírus (HSV-1, HSV-2) e adenovírus (ADV-3, ADV-11) (CHIANG *et al.*, 2002).

Arctigenina apresentou ação inibitória sobre a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (EICH *et al.*, 1996; VLIETINCK *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 2004). Este efeito anti-HIV, também observado por Schroder *et al.* (1990), foi caracterizado pela redução da expressão de proteínas do HIV (p17 e p24) e redução da atividade da transcriptase reversa. Além disso, arctiina (FIGURA 2) e arctigenina extraídas dos frutos de *A. lappa*, mostraram potente atividade antiviral *in vitro* contra o vírus influenza A (A/NWS/33, H1N1) (HAYASHI *et al.*, 2010).

### 2.3.4 Atividade antitumoral

Flavonóides e outros polifenóis antioxidantes encontrados na raiz de bardana podem ser responsáveis por efeitos inibidores de metástases (TAMAYO *et al.*, 2000). O metabólito secundário arctigenina, purificado a partir do extrato solúvel em diclorometano das raízes, apresentou amplo espectro de atividade antitumoral, com citotoxicidade preferencial para as células tumorais em condições privadas de glucose (AWALE *et al.*, 2006).

Machado *et al.* (2012) demonstraram atividade antiproliferativa da fração acetato de etila oriunda do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. lappa*.

### 2.3.5 Atividade antidiabética

Vários estudos têm sugerido que a raiz e/ou frutos são partes da planta com possível efeito hipoglicemiante. Sitosterol- $\beta$ -D-glucopiranosídeo pode ser encontrado na raiz da bardana e tem demonstrado potente efeito inibitório sobre a atividade de  $\alpha$ -glucosidases, que estão envolvidas no processamento de glicoproteínas e na glicogenólise. Inibidores de glucosidases são potenciais agentes terapêuticos no tratamento de diabetes mellitus e obesidade (MITSUO *et al.*, 2005). Além disso, inulina, um carboidrato natural presente na raiz da bardana, pode agir em receptores de superfície celular para manter a glicemia constante e, portanto, melhorar a tolerância aos altos níveis de glucose (SILVER *et al.*, 1931). Xu *et al.* (2008) demonstraram que lignanas totais dos frutos da bardana apresentaram efeito antidiabético em um modelo de diabetes induzida por aloxano em camundongos e podem ajudar a prevenir complicações do diabetes.

## 2.4 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA DE *A. lappa*

As plantas são compostas por uma grande variedade de metabólitos primários e secundários. De modo geral, os metabólitos primários representam substâncias que são produzidas por todas as espécies de plantas, e são geralmente essenciais para a sobrevivência, como é o caso dos carboidratos, lipídeos, aminoácidos (proteínas) e nucleotídeos (AHARONY e GALILI, 2011). Dentre os metabólitos primários, apenas os polissacarídeos serão estudados neste trabalho.

Já os metabólitos secundários são gerados exclusivamente por espécies específicas de plantas e são estruturalmente muito diversos. As principais classes

produzidas pelas plantas podem ser divididas em três grupos: 1) compostos fenólicos; 2) terpenóides; 3) compostos que contêm nitrogênio ou enxofre, tais como alcalóides e glucosinolatos (AHARONY e GALILI, 2011).

Os principais metabólitos secundários isolados de *A. lappa* são:

- Poliacetilenos, como arctinona, arctinol e arctinal (CUNHA *et al.*, 2003);
- Terpenóides, como sesquiterpenos, arctiol,  $\beta$ -eudesmol e fuquinona (BURLANDO *et al.*, 2010);
- Ácidos fenólicos, entre os quais estão os ácidos caféico, clorogênico, cinarina (FERRACANE *et al.*, 2010). Em raízes foram isolados uma série de outros ácidos hidroxicinamoilquínicos (LIN *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2013);
- Lignanas, como arctiina, arctigenina e lapaóis (LIU *et al.*, 2005; FERRACANE *et al.*, 2010). As lignanas isoladas são C, diarctigenina (PARK *et al.*, 2006), matairesinol, arctignan E (FERRACANE *et al.*, 2009) e arctignan D (LIU *et al.*, 2012) foram isoladas somente em sementes;
- Flavonóides, entre os quais estão a quercetina, quercitrina, rutina e luteolina (FERRACANE *et al.*, 2010);
- Fitosteróis ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol), resinas e taninos (BURLANDO *et al.*, 2010).

Dentre os metabólitos primários identificados em *A. lappa*, destacam-se alguns carboidratos, como a inulina, mucilagens, compostos pécnicos e açúcares simples (BURLANDO *et al.*, 2003; KARDOSOVA *et al.*, 2003). Além disso, os ácidos linoléico, linolênico, mirístico e oleico foram descritos como constituintes da fração lipídica (BURLANDO *et al.*, 2003).

## 2.6 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

### 2.6.1 Compostos fenólicos identificados em *A. lappa*

Compostos fenólicos são caracterizados por um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila, e sua estrutura pode variar de uma molécula fenólica simples até um polímero complexo com elevada massa molar (BRAVO, 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT *et al.*, 1998). Os compostos fenólicos podem ser divididos em

várias classes de acordo com o número de anéis fenólicos que possuem e com os elementos estruturais que ligam estes anéis uns aos outros. Os principais grupos de polifenóis são: flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e lignanas (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). Entre os principais grupos de polifenóis encontrados em bardana estão os flavonóides, os ácidos fenólicos e as lignanas.

Lignanas são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de álcoois cinâmicos entre si ou destes com ácido cinâmico (ROYO, 2008). Elas estão presentes na natureza preferencialmente na forma livre em relação à forma de derivados glicosilados (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). Arctiina e arctigenina (FIGURA 2) são as principais representantes desta classe nas várias partes de *A. lappa*. Estes dois metabólitos já foram encontrados nos frutos (LIU *et al.*, 2010), nas sementes (FERRACANE *et al.*, 2009) e nas folhas (LIU *et al.*, 2005), sendo que nas raízes apenas a presença de arctiina foi identificada por Ferracane *et al.* (2009). Nas raízes também foi demonstrada a presença de lapaóis A e B por Ichihara *et al.* (1976). Além de arctiina e arctigenina, as principais lignanas já descritas em sementes de *A. lappa* incluem os lapaóis A, B, C, D, E, F e H (ICHIHARA *et al.*, 1978), isolapaol C, diarctigenina (PARK *et al.*, 2006), matairesinol, arctignan E (FERRACANE *et al.*, 2009) e arctignan D (LIU *et al.*, 2012).

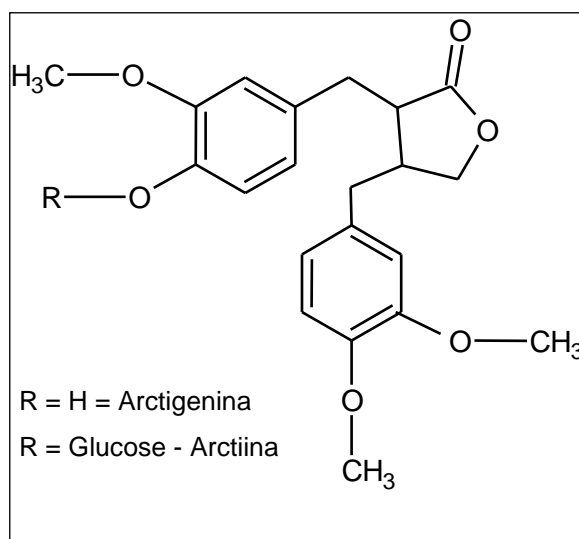


FIGURA 2 – ESTRUTURAS DAS PRINCIPAIS LIGNANAS IDENTIFICADAS EM *A. lappa*.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula (BRAVO, 1998). Eles podem ser divididos em duas classes: ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Os primeiros são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e são menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos (LIN *et al.*, 2008). Os ácidos hidroxicinâmicos são mais abundantes na natureza, sendo que alguns exemplos desta classe de compostos são: ácido caféico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico. Na maioria das vezes estes ácidos hidroxicinâmicos encontram-se esterificados ao ácido quínico, ácido tartárico ou carboidratos e derivados (BASTOS *et al.*, 2007).

Os ácidos clorogênicos são formados quando o ácido quínico é esterificado por um dos seguintes ácidos *trans*-cinâmicos: ácido caféico, ferúlico, sinápico ou *p*-cumárico. Na bardana, são encontrados principalmente os ácidos clorogênicos derivados do ácido caféico. Como o ácido quínico apresenta 4 grupos hidroxilas (posições 1, 3, 4 e 5) e todas estas são passíveis de esterificação pelo ácido caféico, estes ácidos clorogênicos podem formar quatro isômeros de ácidos monocateoilquínicos, seis ácidos dicafeoilquínicos (1,3-, 1,4-, 1,5-, 3,4-, 3,5-, e 4,5-), e quatro ácidos tricafeoilquínicos (1,3,4-, 1,3,5-, 1,4,5-, e 3,4,5-). Destes ácidos, o mais comum é o ácido 3-O-cafeoilquínico, também conhecido como ácido clorogênico (LIN *et al.*, 2008).

Estudo realizado por Ferracane *et al.* (2009) demonstrou a existência de cinarina, ácido clorogênico e ácido caféico nas raízes, sementes e folhas da bardana (FIGURA 3). Nas folhas da planta, além da existência dos ácidos acima descritos, foi relatada por Lou *et al.* (2010) a presença de ácido *p*-cumárico e ácido *o*-hidroxibenzóico. Até o momento não existem relatos na literatura a respeito de outros ácidos fenólicos existentes em folhas de *A. lappa*. Já em estudo com as raízes da planta, foram detectados vinte e quatro ácidos clorogênicos distintos, constituindo uma complexa mistura de ácidos mono-, di- e trihidroxicinamoilquínicos (LIN *et al.*, 2008). Uma mistura de ácidos hidroxicinamoilquínicos, principalmente isômeros dicafeoilquínicos, também foi reportada em raízes por Da Silva *et al.*, (2013). Além disso, Jaiswal *et al.* (2011) identificou, também na raiz da planta, quinze diferentes ácidos clorogênicos (di- e tricafeoilquínicos) substituídos com ácidos fumárico, succínico e málico.

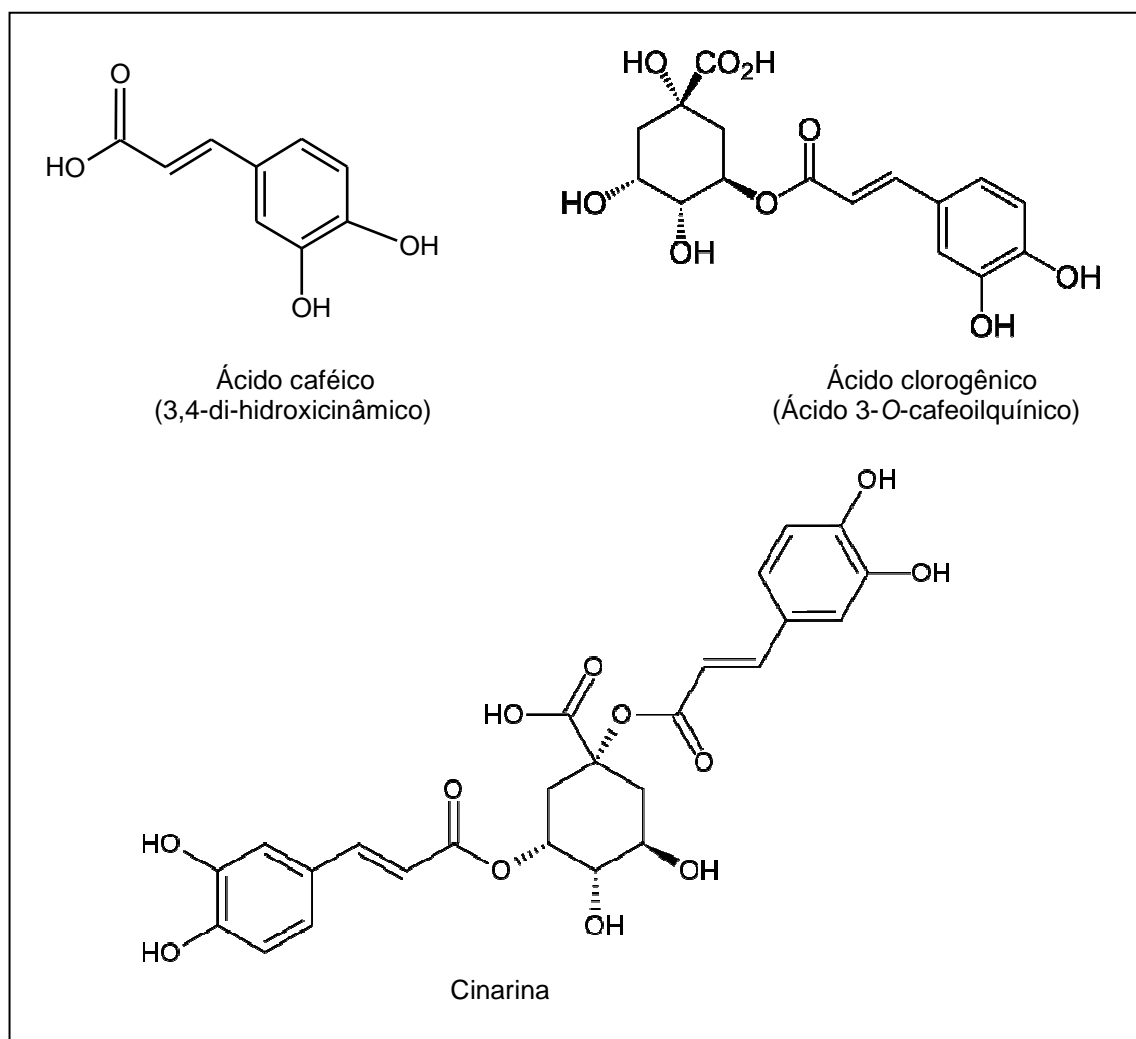


FIGURA 3 – ESTRUTURAS DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS EM *A. lappa*.

Flavonóides são compostos de baixa massa molar, consistindo de 15 átomos de carbono, arranjados em uma configuração  $C_6-C_3-C_6$ . Essencialmente a estrutura consiste de dois anéis aromáticos, A e B, unidos por uma ponte de três carbonos, usualmente na forma de um anel heterocíclico, C (IGNAT *et al.*, 2011). Ferracane *et al.* (2009) descreveram os flavonóides quercetina, quercitrina, rutina e luteolina (FIGURA 4) em raízes e folhas de bardana. Nas sementes não foi encontrada a presença de flavonóides.

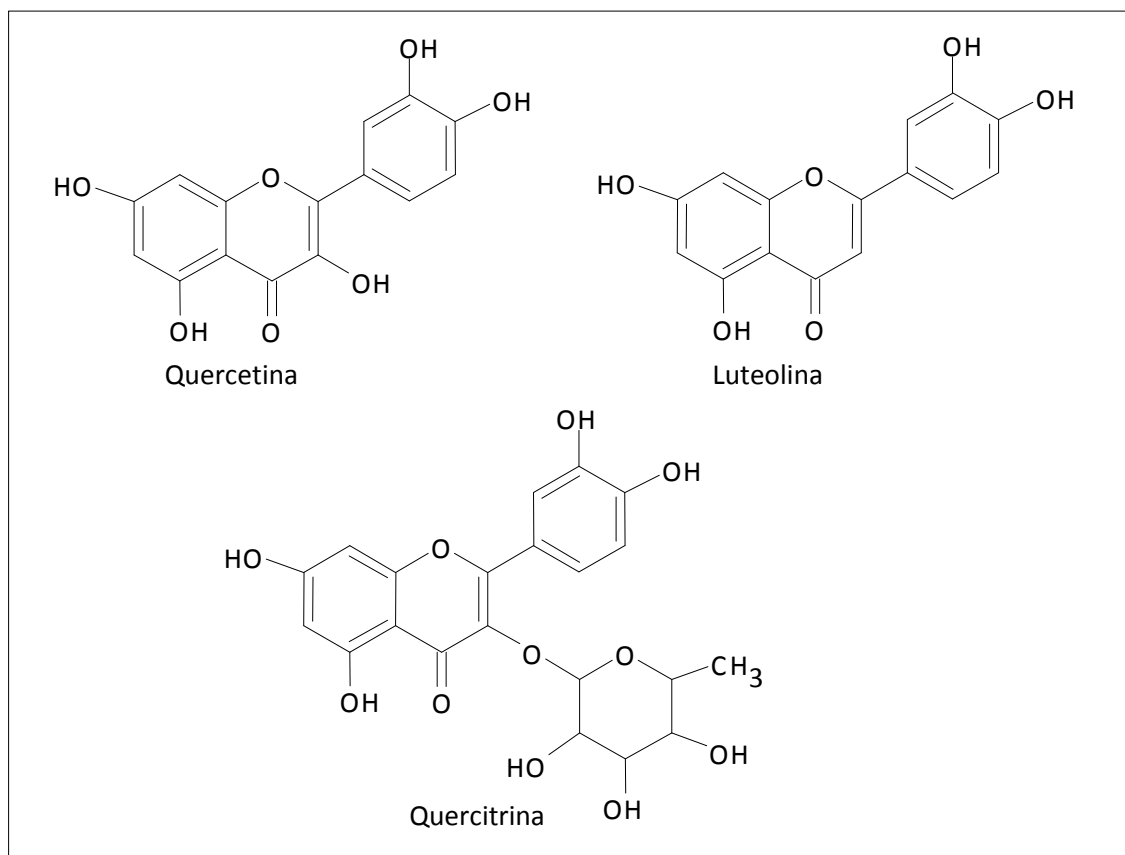


FIGURA 4 – ESTRUTURAS DOS PRINCIPAIS FLAVONÓIDES IDENTIFICADOS EM *A. lappa*.

#### 2.6.2 Terpenóides identificados em *A. lappa*

Estes metabólitos também podem ser chamados de isoprenóides, porque eles derivam da ligação de resíduos de isoprenos. Na natureza, os terpenóides ocorrem predominantemente como hidrocarbonetos, álcoois e seus glicosídeos, éteres, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres. Dependendo do número de unidades de isopreno, os terpenóides são classificados como mono (2), sesqui (3), di (4), ses (5), tri (6), tetra (8) e politerpenos (>8).

Os terpenóides arctiol,  $\beta$ -eudesmol e fuquinona foram descritos em *A. lappa* (BURLANDO *et al.*, 2010). Jeelani e Khuroo (2011) relataram a presença dos triterpenóides 3- $\alpha$ -hidroxilanosta-5,15-dieno e 3- $\alpha$ -acetoxi-hop-22(29)-eno em extrato das folhas da planta.

#### 2.6.3 Atividade antiúlcera gástrica de ácidos fenólicos



Vários estudos têm sugerido que diferentes tipos de ácidos fenólicos presentes em diversos extratos de plantas podem estar relacionados à atividade antiúlcera gástrica.

O suco do fruto do cacto *Opuntia ficus indica* inibiu a atividade ulcerogênica do etanol em ratos, sendo que ácido ferúlico foi o principal derivado do ácido hidroxicinâmico identificado no suco do referido fruto (Galati *et al.*, 2003).

Barros *et al.* (2008) demonstraram a atividade antiulcerogênica dos ácidos fenólicos do própolis verde brasileiro, que apresenta entre seus principais constituintes os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e cinâmico. Os ensaios antiúlcera foram realizados usando os protocolos de úlcera induzida por anti-inflamatórios não esteroidais, úlcera induzida por etanol e úlcera induzida por estresse.

Em estudo realizado por Hamauzu *et al.* (2008) foi demonstrado que o suco de maçã da variedade Fugi apresentou atividade antiúlcera gástrica no modelo de úlcera induzida por etanol/HCl em ratos. O suco de maçã apresenta em sua composição principalmente o ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico), seguido por (-)-epicatequina e procianidina B2.

Santos *et al.* (2012) demonstraram que o extrato metanólico das folhas da planta *Byrsonima intermedia* apresenta atividade antiúlcera gástrica e duodenal, sendo os compostos presentes neste extrato uma mistura de ácidos fenólicos, flavonóides e proantocinidinas.

Estudo realizado por Silva *et al.* (2013) demonstrou que o extrato etanólico bruto das raízes da planta *A. lappa* apresenta atividade antiúlcera gástrica. Os principais constituintes deste extrato são uma série de ácidos hidroxicinamoilquínicos, principalmente isômeros dicafeoilquínicos, sendo que a identificação precisa de cada isômero não foi realizada.

## 2.5 CARBOIDRATOS DE PLANTAS

Nas plantas, os carboidratos existem como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, tais como glicosídeos cianogênicos e fenólicos, flavonóides glicosilados e glicoproteínas (AVIGAD e DEY, 1997).

Depois da água, os carboidratos estruturais são os principais constituintes químicos em tecidos de plantas e células vegetais. Isto se deve ao fato dos carboidratos formarem a parede celular, que é a rede de suporte estrutural da célula vegetal (REID, 1997).

### 2.5.1 Parede celular

A parede celular é uma complexa estrutura macromolecular que envolve e protege a célula, e é essencial para a sobrevivência das plantas. A estrutura da parede celular é continuamente modificada para acomodar o estágio de desenvolvimento da planta e se adaptar às condições ambientais às quais ela está submetida (CAFFALL *et al.*, 2009).

Durante o crescimento inicial e expansão da célula são formadas a lamela média e a parede celular primária. Na fase de diferenciação celular, muitas células elaboram dentro da parede primária uma parede celular secundária, que é mais espessa e reforçada (CARPITA e McCANN, 2000). A parede primária contribui para a integridade estrutural da célula, adesão celular e transdução de sinal, e é caracterizada por uma quantidade relativamente menor de celulose e maior de pectina comparada à parede secundária (CARPITA E GIBEAUT, 1993).

A parede celular da planta apresenta uma composição altamente organizada de diferentes polissacarídeos, proteínas e substâncias aromáticas. A composição molecular e o arranjo dos polímeros na parede diferem entre as espécies, entre tecidos de uma única espécie, entre células individuais e entre regiões da própria parede (CARPITA e McCANN, 2000).

A parede celular primária é composta de aproximadamente 10% de proteínas e 90% de polissacarídeos, os quais são divididos em três grupos, de acordo com o modo de obtenção: pectinas, hemiceluloses e celulose. As pectinas podem ser extraídas com água; as hemiceluloses com soluções alcalinas; e a celulose é o residual insolúvel após as extrações aquosa e alcalina (DEY, 1997).

Estudo realizado por Carpita e Gibeaut (1993) descreve dois modelos distintos de parede celular primária para angiospermas. As dicotiledôneas e monocotiledôneas, com exceção das gramíneas, apresentam paredes ricas em pectina e hemicelulose, denominadas paredes tipo I. A parede primária das gramíneas, chamadas tipo II, contém pouca pectina e proporcionalmente mais

hemicelulose. Na parede celular primária tipo I (FIGURA 5), microfibrilas de celulose estão entrelaçadas por xiloglucanas e esta estrutura está embutida numa matriz de polissacarídeos pécticos, homogalacturonanas e ramnogalacturonanas, sendo que estas últimas podem estar substituídas por pequenos grupos laterais de arabinana, galactana e arabinogalactana. Na parede tipo II, as microfibrilas de celulose são entrelaçadas por glucuronoarabinoxilanas e apenas uma pequena quantidade de pectina está presente.

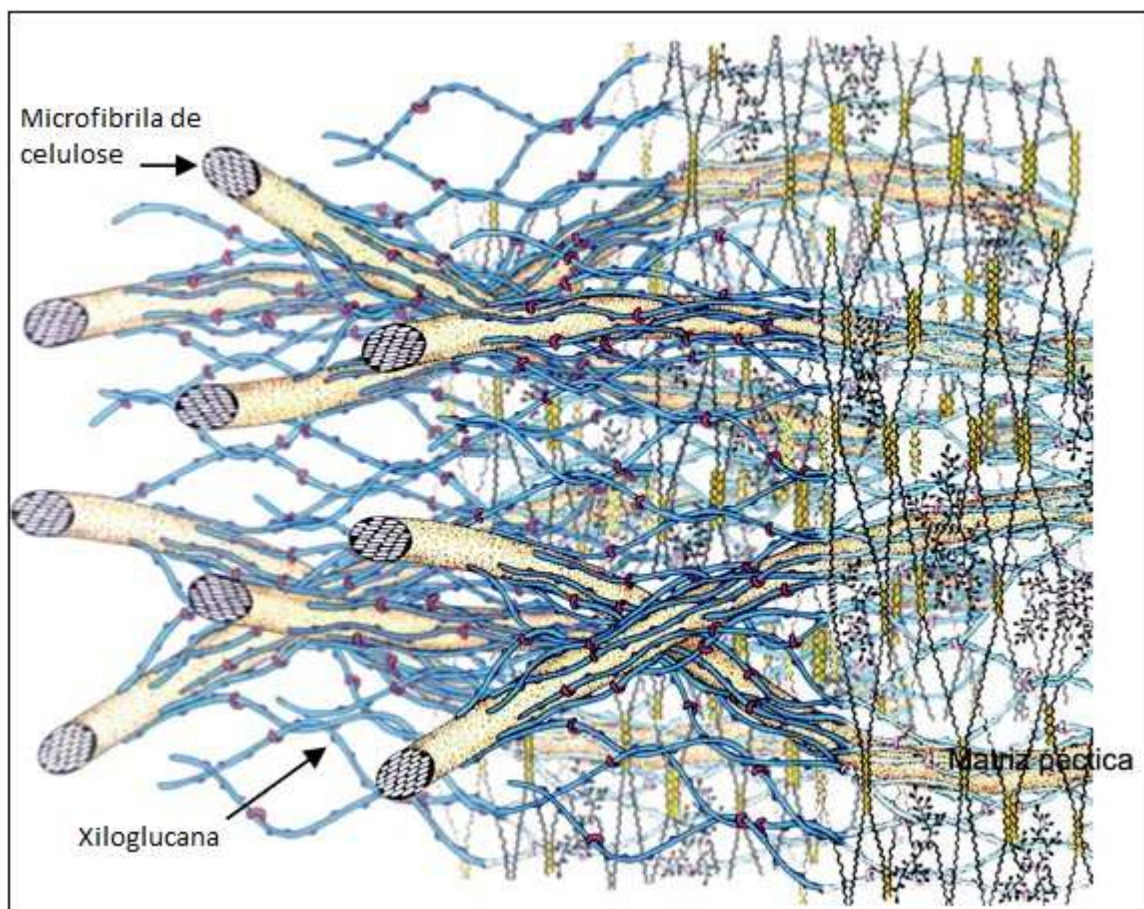


FIGURA 5 – MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I (CARPITA E GIBEAUT, 1993).

### 2.5.2 Pectinas

As pectinas apresentam em sua composição grande quantidade de ácido galacturônico (GalA) com ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1→4) (MOHNEN, 2008). Os polissacarídeos pécticos compõem 35% da parede primária de dicotiledôneas e

monocotiledôneas não-gramíneas, e de 2 a 10% de gramíneas e outras comelinóides (RIDLEY *et al.*, 2001).

As principais classes estruturais dos polissacarídeos pécticos são: homogalacturonana (HG), xilogalacturonana (XGA), ramnogalacturonana tipo II (RGII), ramnogalacturonana tipo I (RGI), arabinana, galactana e arabinogalactanas (AGs) tipo I e II (CARPITA e McCANN, 2000). As últimas três classes de polímeros descritas constituem as substâncias pécticas neutras.

Homogalacturonana é um polímero linear de unidades de  $\alpha$ -D-GalpA unidas por ligação (1 $\rightarrow$ 4), que compreende mais de 60% da quantidade de polissacarídeos pécticos da parede celular vegetal. Resíduos de ácido galacturônico podem ser metil-esterificados na carboxila C-6, e podem ser O-acetilados nas posições O-2 ou O-3. O padrão de esterificação ou metilação varia para cada tipo vegetal (RIDLEY *et al.*, 2001). Xilogalacturonana é uma HG substituída na cadeia principal por resíduos de D-xilose na posição O-3 (RIDLEY *et al.*, 2001).

RGII é o polissacarídeo péctico estruturalmente mais complexo. Sua estrutura altamente conservada consiste de uma cadeia principal de unidades de  $\alpha$ -D-GalA unidos por ligação (1 $\rightarrow$ 4), com cadeias laterais constituídas de doze tipos diferentes de açúcar, ligados por vinte diferentes tipos de ligação. Entre os diversos tipos de açúcares, estão inclusos apiose, ácido acérico (3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose), 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose e outros (CAFFAL *et al.*, 2009).

RGI representa 20-35% dos polissacarídeos pécticos (MOHNEN, 2008). É um heteropolímero constituído por repetições do grupo dissacarídico [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ )] (CARPITA e GIBEAUT, 1993). As RGI também podem ser constituídas por longos segmentos de [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1 $\rightarrow$ )], eventualmente interrompidos por unidades de [ $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ )]. Elas podem ser ramificadas por arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas, na posição O-4 de algumas unidades de ramnose (FIGURA 6) (CARPITA e McCANN, 2000). Em geral, quase metade das unidades de ramnose apresenta cadeias laterais, mas isto pode variar de acordo com o tipo celular e o estado fisiológico. Além disso, unidades de ácido galacturônico podem ser acetiladas nas posições O-2 e/ou O-3 e podem ser metil-esterificados na carboxila C-6 (KOMALAVILAS e MORT, 1989).

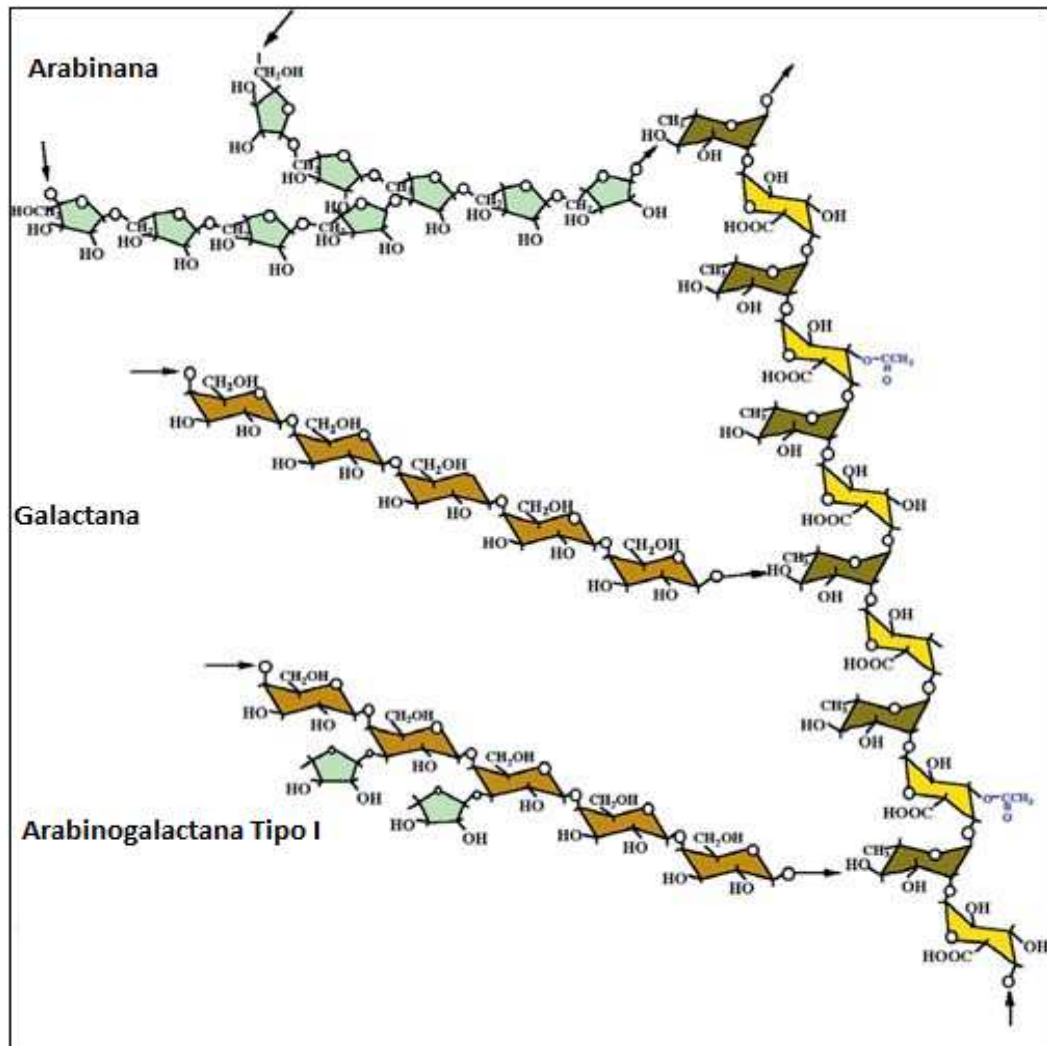


FIGURA 6 – ESTRUTURA BÁSICA DE RAMNOGALACTURONANA TIPO I (RGI) COM CADEIAS LATERAIS DE (1→4)-β-D-GALACTANA, (1→5)-α-L-ARABINANA E ARABINOGALATANA TIPO I (AGI) (CARPITA E MCCANN, 2000).

Arabinanas e galactanas puras estão presentes na parede celular de plantas em quantidade muito baixa. As arabinanas são polímeros de (1→5)-α-L-arabinose com algum grau de ramificação nas posições O-2, O-3 ou em ambas. Galactanas são polímeros lineares com ligações β-(1→4), que podem possuir um pequeno número de resíduos ligados na posição 6 (REID, 1997).

As arabinogalactanas podem ser classificadas em dois tipos, de acordo com as diferenças nas ligações químicas envolvidas na formação da cadeia principal destas macromoléculas. O tipo I é caracterizado por uma cadeia principal de (1→4)-β-D-galactana. Enquanto que o tipo II é caracterizado por uma cadeia principal formada por (1→3) e (1→6)-β-D-galactana (ASPINAL, 1973).

As arabinogalactanas tipo I são encontradas somente em frações pécicas, geralmente associadas às ramnogalacturonanas tipo I. Elas apresentam, na maioria das vezes, unidades de arabinose ligadas na posição O-3 dos resíduos de galactose (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

As arabinogalactanas tipo II (FIGURA 7) estão presentes na parede celular vegetal, ramificando ou não as ramnogalacturonanas (STEPHEN, 1983). Elas podem também estar ligadas a proteínas, constituindo uma classe de proteoglicanas denominadas arabinogalactanas-proteínas (AGPs) (CARPITA e McCANN, 2000).

As arabinogalactanas tipo II apresentam uma estrutura fina que varia muito entre as espécies (CARPITA e GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM *et al.*, 1996). Estes polissacarídeos apresentam a maior parte das unidades de galactose com as posições O-3 e O-6, que não estão envolvidas na ligação da cadeia principal, substituídas com resíduos de arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Também podem ser observadas substituições com monossacarídeos ácidos, como ácido glucurônico, ácido 4-O-metil-glucurônico e ácido galacturônico (STEPHEN, 1983).

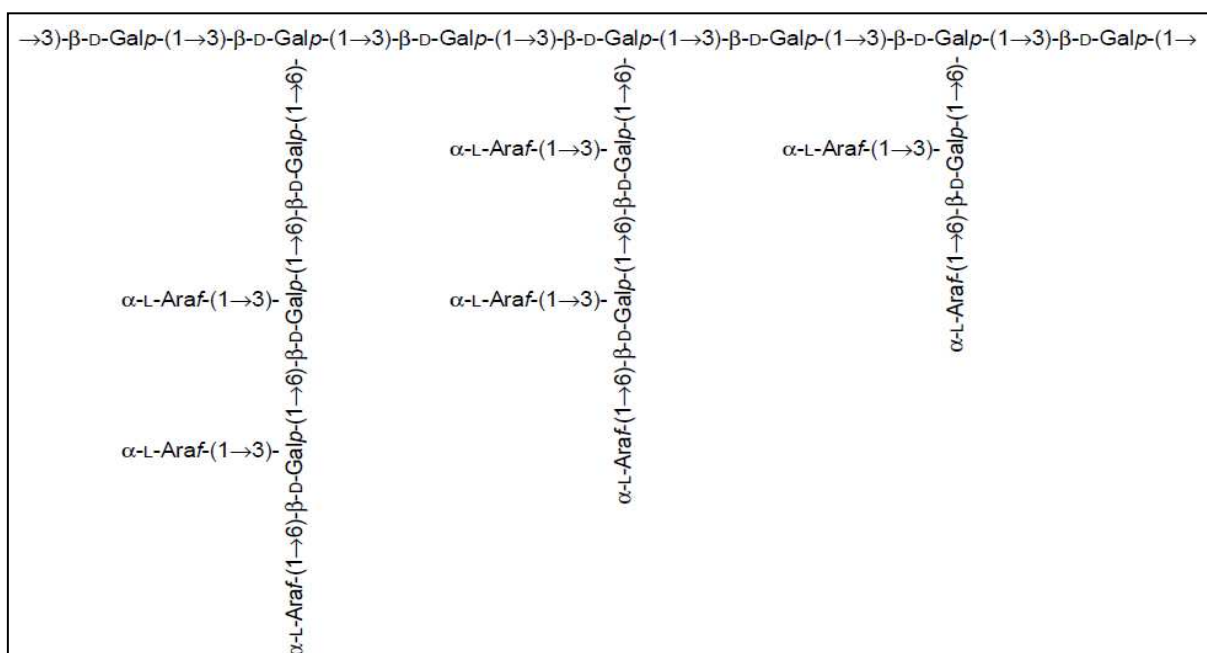


FIGURA 7 – ESTRUTURA DAS ARABINOGLACTANAS TIPO II (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

### 2.5.3 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente em tecidos lignificados (ASPINAL, 1959). As hemiceluloses são constituídas por unidades monossacarídicas de D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, ácido 4-O-metilglucurônico, ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico, e eventualmente apresentam grupamentos O-acetil ligados às unidades pertencentes às cadeias principal e/ou lateral (FENGEL e WEGNER, 1989). Os principais tipos de hemiceluloses encontrados na parede celular vegetal são xilanas, mananas e xiloglucanas.

As xilanas contêm uma cadeia principal constituída por unidades de  $\beta$ -D-xilose (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas e podem ser encontradas como arabinoxilanas (AX), glucuronoarabinoxilanas (GAX), glucuronoxilanas (GX) ou homoxilanas não substituídas. Xilanas podem ser acetiladas nas posições O-2 ou O-3 (CAFFALL *et al.*, 2009).

As mananas incluem as galactomannas (GMs) e as galactoglucomananas (GGMs), que são componentes estruturalmente importantes da parede celular, além de serem encontradas como polissacarídeos de reserva em alguns vegetais (CAFFALL *et al.*, 2009).

Xiloglucanas são constituídas por uma cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-glucose (1 $\rightarrow$ 4)-ligadas, com numerosos resíduos de  $\alpha$ -D-xilose ligados na posição O-6 das unidades de glucose. Além disso, alguns destes resíduos de xilose podem ser substituídos com  $\alpha$ -L-arabinose ou  $\beta$ -D-galactose, e algumas vezes a unidade de galactose pode estar substituída com  $\alpha$ -L-fucose (CARPITA e McCANN, 2000).

#### 2.5.4 Atividade anti-inflamatória promovida por polissacarídeos

Atividade anti-inflamatória promovida por polissacarídeos isolados de várias espécies de fungos, algas e vegetais tem sido descrita na literatura. Estudo realizado por Smiderle *et al.* (2008) mostrou que um polímero de (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosose extraído com água quente do basidiomiceto *Pleurotus pulmonarius* demonstrou atividade anti-inflamatória quando administrado sistemicamente em camundongos, promovendo uma diminuição da infiltração leucocitária e redução da permeabilidade capilar peritoneal induzidas por ácido acético. Além disso, esta glucana demonstrou inibição de dor inflamatória no teste da formalina.



Carbonero *et al.* (2008) isolaram do basidiocarpo do fungo *Lentinus edodes* uma fucomanogalactana com propriedades anti-inflamatórias nos testes de permeabilidade capilar peritoneal e infiltração leucocitária promovidas por ácido acético em camundongos. Esta fucomanogalactana apresenta em sua estrutura química uma cadeia principal de (1→6)- $\alpha$ -D-Galp, parcialmente substituídas na posição O-2 por unidades de  $\beta$ -D-Manp ou  $\alpha$ -L-Fucp.

Um polissacarídeo péptico com efeito anti-inflamatório no modelo de choque endotóxico foi isolado de talos de aipo (*Apium graveolens* var. *Dulce*). Este polímero consiste de um cadeia principal de (1→4)- $\alpha$ -D-galacturonana interrompida por unidades de [ $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1→], com cadeias laterais de Ara e Gal ligadas na posição 4 dos resíduos de Rha. No modelo testado, este polissacarídeo foi responsável pelo aumento da sobrevivência de camundongos submetidos a uma dose letal de LPS, sendo este efeito mediado pela diminuição na produção de interleucina-1 $\beta$  (pró-inflamatória) e aumento de interleucina-10 (anti-inflamatória), e pela diminuição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após injeção de LPS (OVODOVA, 2009).

Ananthi *et al.* (2010) isolaram da alga *Turbinaria ornata* um polissacarídeo ácido que demonstrou atividade anti-inflamatória. A avaliação desta atividade foi realizada por meio do modelo de edema de pata induzida por carragenina em ratos e do teste de permeabilidade vascular em camundongos.

Em estudo realizado por Liu *et al.* (2012) foram isolados do suco de morango e da amora polissacarídeos que apresentaram forte potencial anti-inflamatório via modulação do perfil de secreção de citocinas pró-/anti-inflamatórias secretadas por culturas de macrófagos estimuladas por LPS. O tratamento com os polímeros isolados diminuiu os níveis das citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina-1 $\beta$  e interleucina-6, enquanto que aumentou o nível da citocina anti-inflamatória interleucina-10.

#### 2.5.5 Atividade antiúlcera gástrica promovida por polissacarídeos

Yamada *et al.* (1991) isolaram do extrato aquoso das raízes de *Bupleurum falcatum* um polissacarídeo péptico com elevado teor de ácido galacturônico e pequenas proporções de arabinose, ramnose e galactose, que mostrou potente atividade contra úlcera gástrica induzida por etanol/HCl.



Sun *et al.* (1992) verificaram que a administração oral ou subcutânea de uma fração polissacarídica solúvel em água das folhas de *Panax ginseng*, em estudo realizado em ratos e camundongos, foi capaz de inibir a formação de lesão gástrica induzida por etanol/HCl, etanol, estresse por imersão em água, indometacina e ligadura de piloro.

Estudo realizado por Nergard *et al.* (2005) mostrou que o extrato aquoso bruto das raízes de *Cochlospermum tinctorium* (composto de 59,3% de polissacarídeos e 9,3% de polifenóis) reduziu de maneira dose-dependente a formação de úlcera gástrica induzida por etanol/HCl em camundongos.

Polissacarídeos pécticos ligados a compostos fenólicos, extraídos das raízes de *Decalepis hamiltonii*, exibiram um efeito protetor contra úlceras induzidas por estresse em modelos animais. Além disso, eventos correlacionados com úlceras gástricas instaladas, como quantidade diminuída de muco gástrico e de enzimas antioxidantes, e aumento da atividade da bomba  $H^+/K^+$  ATPase, foram suprimidos após a utilização do extrato, com retorno ao estado de homeostasia (SRIKANTA *et al.*, 2007).

Estudos envolvendo polissacarídeos purificados têm sido realizados para avaliação da atividade antiúlcera gástrica. Cipriani *et al.* (2006) demonstraram atividade antiúlcera de uma arabinogalactana tipo II, purificada a partir do chá das folhas de *Maytenus ilicifolia*, em estudo envolvendo lesão gástrica aguda induzida por etanol em ratos. Ainda utilizando este mesmo protocolo, foi demonstrada a atividade antiúlcera de duas heteroxilanas ácidas, isoladas de *Maytenus ilicifolia* e *Phyllanthus niruri* (CIPRIANI *et al.*, 2008), de duas arabinogalactanas tipo I, purificadas do farelo de soja (CIPRIANI *et al.*, 2009) e da goma viscosa exudada pelo cacto *Cereus peruvianus* (TANAKA *et al.*, 2010). Cordeiro *et al.* (2012) demonstraram atividade gastroprotetora de arabinanas isoladas das sementes de quinoa (*Chenopodium quinoa*) e Nascimento *et al.* (2013) de uma ramnogalacturonona tipo I isolada das folhas de *Acmella oleracea*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, caracterizar estruturalmente polissacarídeos e metabólitos secundários de folhas de *A. lappa* e avaliar suas propriedades biológicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair polissacarídeos de folhas de *A. lappa* por extração aquosa e alcalina, purificá-los e caracterizá-los;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antiúlcera gástrica dos polissacarídeos purificados do extrato aquoso;
- Extrair e caracterizar estruturalmente metabólitos secundários das folhas de *A. lappa*;
- Realizar fracionamento bioguiado pela atividade antiúlcera gástrica a fim de identificar os metabólitos secundários relacionados a este efeito.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas de *A. lappa* secas e moídas foram gentilmente cedidas pela empresa Chamel - Indústria e Comércio de Produtos Naturais Ltda - da cidade de Campo Largo, Paraná. O processamento deste produto foi realizado em setembro de 2010. Exemplar da mesma espécie está depositado no herbário do Departamento de Botânica da UFPR sob o número 37173.

### 4.2 DESLIPIDIFICAÇÃO E DESPIGMENTAÇÃO DO MATERIAL DE ESTUDO

As folhas trituradas (500 g) foram deslipidificadas e despigmentadas com clorofórmio:metanol (2:1, v/v) em extrator soxhlet. O resíduo deste processo foi seco e submetido ao processo de extração de polissacarídeos e metabólitos secundários.

### 4.3 OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA

O resíduo seco da extração com clorofórmio:metanol foi submetido à extração aquosa (1 L de água destilada), sob refluxo, por 2 horas. Este processo foi repetido três vezes. Após cada etapa, o extrato aquoso bruto foi filtrado a quente. O material resultante das três extrações foi reunido, concentrado sob baixa pressão em evaporador rotativo até pequeno volume (300 mL), tratado com 3 volumes de etanol e filtrado a vácuo (utilizando-se papel de filtro qualitativo), a fim de separar precipitado e sobrenadante. A fração precipitada em etanol (FPE), que continha os polissacarídeos, foi posteriormente dialisada em membranas com limite de exclusão de 12-14 kDa e liofilizada. A fração solúvel em etanol (FSE), que continha os compostos de baixa massa molar, incluindo metabólitos secundários, foi concentrada sob baixa pressão em evaporador rotativo e então liofilizada.

### 4.4 OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS POR EXTRAÇÃO ALCALINA

O resíduo da extração aquosa, adicionado de aproximadamente 1 g de boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), foi submetido à extração com 1 L de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) 2% (p/v), sob refluxo, por 2 horas. Este processo foi repetido três vezes. Após cada etapa, o extrato foi filtrado a quente. O material resultante após as três extrações foi reunido, neutralizado com ácido acético glacial e concentrado em evaporador rotativo até volume de 300 mL. Posteriormente o extrato foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 12-14 kDa e liofilizado, originando o extrato alcalino bruto (EB).

#### 4.5 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

Todas as frações oriundas das etapas de fracionamento do extrato aquoso foram iniciadas com a letra “A” e as frações oriundas do extrato alcalino ou básico com a letra “B”, seguidas do nome que indica a etapa de fracionamento a que o material foi submetido.

##### 4.5.1 Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo

As frações EB e FPE foram submetidas ao procedimento de congelamento e degelo. Inicialmente as amostras foram solubilizadas em água destilada, congeladas e, posteriormente, descongeladas à temperatura ambiente. O precipitado formado após o degelo foi separado por centrifugação (8.000 rpm/15min a 4 °C). Este processo foi repetido até a inexistência de precipitado (5 vezes) após o congelamento e descongelamento dos sobrenadantes. Duas frações solúveis em água fria (sobrenadante de gelo e degelo) foram obtidas: ASGD e BSGD. E duas frações insolúveis em água fria (precipitado de gelo e degelo) foram também obtidas: APGD e BPGD. Todas as frações foram concentradas e liofilizadas.

##### 4.5.2 Fracionamento dos polissacarídeos por variação do pH do meio

As frações ASGD e BSGD foram submetidas ao processo de purificação pela variação do pH do meio. As frações foram solubilizadas em água destilada, às quais foi adicionado ácido acético até concentração final de 5% (pH do meio ~3). O precipitado obtido foi separado do sobrenadante por ultrafiltração com membrana de

acetato de celulose (Millipore) com tamanho médio dos poros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Duas frações solúveis em ácido acético foram obtidas: ASAA e BSAA. E duas frações insolúveis foram também obtidas: APAA e BPAA. Todas as frações foram dialisadas em membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa. Posteriormente, foram concentradas em evaporador rotativo e liofilizadas.

#### 4.5.3 Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração

As frações ASAA e BSAA foram solubilizadas em água destilada para concentração de 1% e submetidas à ultrafiltração em membranas de polietersulfona (Sartorius) com limites de exclusão de 50 kDa. A fração ASAA originou uma fração retida (ARF50) e outra eluída nesta membrana, enquanto que a fração BSAA eluiu completamente.

As frações eluídas foram submetidas a uma nova filtração utilizando membrana de polietersulfona (Sartorius) com limite de exclusão de 30 kDa. Frações retidas (ARF30 e BRF30) e eluídas (AEF30 e BEF30) foram obtidas nesta nova filtração. Em seguida, todas as frações geradas foram liofilizadas.

### 4.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS

#### 4.6.1 Composição monossacarídica

##### 4.6.1.1 Hidrólise dos polissacarídeos

A composição monossacarídica foi realizada para todas as frações contendo polissacarídeos. Ela foi determinada após a hidrólise de aproximadamente 2 mg de cada extrato com 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 2 M, em estufa a 100 °C por 8 h. As soluções foram evaporadas até a secura e o resíduo dissolvido em 2 mL de água destilada. O material dissolvido foi dividido em duas partes, sendo uma delas destinada à realização de cromatografia em camada delgada (TLC – *thin layer chromatography*) e a outra à realização de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS – *gas chromatography mass spectrometry*).

#### 4.6.1.2 Redução e acetilação dos monossacarídeos

Para a realização de análise por GC-MS foi necessário converter os monossacarídeos obtidos por hidrólise a seus respectivos derivados voláteis (acetatos de alditóis), pelo procedimento de redução e acetilação das unidades monossacarídicas. A redução foi realizada pela adição de  $\text{NaBH}_4$  até pH 9,0. Após 18 h a temperatura ambiente, foi adicionado ácido acético até obtenção de pH abaixo de 7,0. O material foi, então, evaporado até a secura e o ácido bórico resultante foi removido como borato de trimetila, por repetidas evaporações com metanol (WOLFROM e THOMPSON, 1963). Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v; 300  $\mu\text{L}$ ), à temperatura ambiente, por 14 h. As reações de acetilação foram interrompidas com gelo e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio, que foi lavado diversas vezes com solução aquosa de  $\text{CuSO}_4$  a 5% para a eliminação da piridina residual. Os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por ionização por elétrons (70 eV).

#### 4.6.2 Metilação dos polissacarídeos isolados

As frações ARF50, ARF30, AEF30, BRF30 e BEF30 nativas e a fração ARF30 carboxirreduzida (item 4.6.3) foram submetidas ao processo de metilação pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). O polissacarídeo a ser metilado (5 mg) foi solubilizado em 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Excesso de hidróxido de sódio (NaOH) triturado e seco foi adicionado à solução, seguido pela adição de 0,5 mL de iodeto de metila ( $\text{CH}_3\text{I}$ ), agitação em vortex por 30 min e repouso por 24 h. A metilação foi interrompida com água destilada e a solução acidificada até pH 6 com ácido acético. O material foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa e liofilizado. O polissacarídeo liofilizado foi hidrolisado com ácido fórmico 45% (v/v, 1 mL) por 17 h em estufa à 100 °C. A solução foi evaporada até a secura, seguida pela adição de 1 mL de água destilada. O material hidrolisado foi reduzido e acetilado conforme descrito no item 5.6.1.2, exceto pelo fato que neste caso foi utilizado boroidreto de sódio deuterado ( $\text{NaBD}_4$ ) em vez de  $\text{NaBH}_4$ . Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelos

seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por ionização por elétrons (70 eV) (JANSSON *et al.*, 1976; SASSAKI *et al.*, 2005).

#### 4.6.3 Carboxirredução pelo método de Taylor e Conrad (1972)

A fração ARF30 foi submetida ao processo de carboxirredução. O polissacarídeo (10 mg) foi dissolvido em 5 mL de tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 mol/L, pH 4,75) e a este foi adicionado, pouco a pouco e sob agitação, 50,4 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida], sendo 24 mg de carbodiimida para cada mg de ácido urônico (determinado colorimetricamente) contido na amostra. A mistura de reação ficou sob agitação por 2 h. Em seguida, foi adicionado tampão TRIS [tris-(hidroximetil)aminometano] (2 mol/L, pH 7,0) até pH 7,0 (2,5 mL) e, posteriormente, NaBH<sub>4</sub> para uma concentração final de 2 mol/L (567 mg). Durante a adição do NaBH<sub>4</sub> o pH da solução foi monitorado e ajustado para 7,0, quando necessário, com HCl diluído. A redução foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5,0. O material foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa, concentrado e liofilizado. O material liofilizado foi novamente dissolvido no tampão MES e um novo ciclo de carboxirredução foi realizado, repetindo-se todos os procedimentos acima descritos.

### 4.7 FRACIONAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS, BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIÚLCERA GÁSTRICA

A fração FSE, obtida conforme item 4.3, foi inicialmente submetida ao teste para avaliação da atividade gastroprotetora, conforme descrito no item 4.11.1, e depois fracionada por partição líquido:líquido.

Este fracionamento foi realizado com uma parte da fração FSE (30 g), a qual foi solubilizada em 100 mL de água destilada e depois particionada, de maneira sequencial, com 50 mL de clorofórmio (5 vezes), 50 mL de acetato de etila (5 vezes) e 50 mL de butanol (5 vezes).

O processo de partição rendeu quatro frações: solúvel em clorofórmio (FSE-C), solúvel em acetato de etila (FSE-AE), solúvel em butanol (FSE-B) e aquosa

(FSE-AQ), que é a fração residual após as extrações com todos os solventes utilizados.

Todas as frações obtidas por partição líquido:líquido foram também submetidas ao teste de atividade antiúlcera gástrica (item 4.11.1).

#### 4.8 ANÁLISE ESTRUTURAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

##### 4.8.1 Modificação química de ácidos dicafeoilquínicos - acetalação

As frações FSE-AE e FSE-B foram submetidas ao procedimento de acetalação. As amostras (1 mg) foram dissolvidas em 1 mL de acetona contendo 2 mg de ácido *p*-toluenossulfônico. As soluções foram agitadas por 3 horas e a reação foi interrompida pela adição de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) até a neutralidade. Estas soluções foram centrifugadas e os sobrenadantes retirados. Estas amostras foram dissolvidas em  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  (7:3) e analisadas por UHPLC-MS.

##### 4.8.1 Metanólise e acetilação

As frações FSE-AE e FSE-B foram submetidas ao procedimento de metanólise e acetilação. As amostras (1 mg) foram solubilizadas em 300  $\mu\text{L}$  de metanol/HCl anidro 1N e deixadas em estufa a 100 °C por 1 hora. Posteriormente foram evaporadas até a secura e acetiladas com uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v, 200  $\mu\text{L}$ ), à temperatura ambiente, por 14 h. As reações de acetilação foram interrompidas com gelo e os derivados acetilados foram extraídos com clorofórmio, que foi lavado diversas vezes com solução aquosa de  $\text{CuSO}_4$  a 5% para a eliminação da piridina residual. As amostras foram analisadas por GC-MS e identificadas pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por ionização por elétrons (70 eV).

#### 4.9 PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO PRESENTE NA FRAÇÃO FSE-AE



A fração FSE-AE foi submetida à cromatografia preparativa para purificação de um isômero desconhecido de ácido dicafeoilquínico. Para isto utilizou-se o HPLC LC10A (Shimadzu) equipado com uma coluna de exclusão por tamanho (SEC - size exclusion chromatography, Ultrahydrogel-120 Waters), com 300 mm x 7,8 mm e  $5 \times 10^3$  Da de limite de exclusão (Waters). A separação foi desenvolvida com um gradiente utilizando H<sub>2</sub>O (solvente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente B) em um fluxo de 1 mL/min a 50 °C. O aumento linear do solvente B foi de 5 a 50% em 30 min, mantido até 35 min, e a condição inicial (95% de A e 5% de B) foi obtida em 43 min. O sistema foi reequilibrado por 10 min antes de cada injeção. Condições de separação cromatográfica semelhantes já foram utilizadas na separação de compostos fenólicos de *Maytenus ilicifolia* e *Camellia sinensis* (SOUZA *et al.*, 2009; SCOPARO *et al.*, 2012). A amostra da fração FSE-AE foi preparada na concentração de 10 mg/mL em MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) e o volume de injeção foi de 100 µL. A detecção foi realizada em 325 nm. Alíquotas foram coletadas no tempo de retenção do pico de interesse. A cromatografia foi repetida por 20 vezes, e as amostras coletadas durante as várias repetições foram reunidas e evaporadas até a secura. A amostra resultante (AE-DCQ) foi analisada por RMN e UHPLC.

#### 4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 4.10.1 Cromatografia em camada delgada (TLC)

A cromatografia em camada delgada foi realizada com as frações polissacarídicas ASGD, APGD, BSGD e BPGD hidrolisadas e foi utilizada para detectar a presença e possibilitar a identificação de ácidos urônicos.

As análises foram realizadas em placas de sílica gel 60G (Merck), com 9 cm de altura total. Como fase móvel utilizou-se a mistura dos solventes 1-propanol:água na proporção 7:3 (v/v). A visualização dos açúcares foi obtida com orcinol-ácido sulfúrico a 100 °C (SKIPSKI, 1975).

##### 4.10.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Os acetatos de alditóis, os acetatos de alditóis parcialmente metilados e os derivados acetilados das frações FSE-AE e FSE-B foram analisados por GC-MS (*gas chromatography mass spectrometry*). Utilizou-se o cromatógrafo da marca Varian 3800 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap Saturn 2000R. A coluna utilizada na separação dos componentes foi a coluna capilar DB-225-MS (J&W). O gás de arraste utilizado foi o hélio (5.0 analítico) em um fluxo de 1 mL/min. Para os acetados de alditóis, durante a injeção da amostra a temperatura do injetor foi de 250 °C e a da coluna de 50 °C, sendo programada para aumentar 40 °C/min, até atingir a temperatura de 220 °C, que foi mantida constante por 25 min. Para a análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados e dos derivados acetilados das frações FSE-AE e FSE-B, durante a injeção da amostra, a temperatura do injetor foi de 250 °C e a da coluna de 50 °C, sendo programada para aumentar 40 °C/min, até atingir a temperatura de 210 °C, que foi mantida constante por 30 min.

#### 4.10.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC— *ultra performance liquid chromatography*) foi utilizada na análise de metabólitos secundários das frações nativas e modificadas quimicamente, bem como de uma amostra conhecida de erva-mate, que serviu como padrão (DARTORA *et al.*, 2011). A cromatografia foi realizada em um sistema Acquity-UPLC™ (Waters, MA, USA), composto por uma bomba binária, amostrador automático e forno de coluna. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente (22°C) e a temperatura da coluna foi de 60°C. A cromatografia foi desenvolvida na coluna BEH-Phenyl (Waters), com dimensões de 50 x 2,1 mm com 1,7 µm de tamanho de partícula.

A fase móvel consistiu de H<sub>2</sub>O contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e metanol (eluente B). O seguinte gradiente fornecido pelo software Empower (Waters, MA, USA) foi desenvolvido: aumento da concentração do solvente B de 3 a 50% em 8 min e retorno à condição inicial em 10 min. O sistema foi reequilibrado por 3 min antes de cada injeção. As amostras (5 mg/mL) foram preparadas em H<sub>2</sub>O:MeOH (8:2, v/v), sendo que 1 µL de amostra foi injetado.

A detecção foi realizada na faixa de 200-400 nm por detector arranjo de fotodiodos (PDA - *photodiode array*) ou, nas análises *online*, por espectrometria de massas.

#### 4.10.4 ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry)

As análises realizadas por ESI-MS foram obtidas em um espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupólo (Waters), com nitrogênio como gás de nebulização e dessolvatação, operando em modo de ionização negativo/positivo. As amostras foram analisadas em modo de íons totais (TIC – *total ion current*) com varredura de íons de  $m/z$  100–1000. Nas análises *offline*, as amostras (1 mg/mL) foram solubilizadas em H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1, v/v) e submetidas a ionização em pressão atmosférica (API – *atmospheric pressure ionization*). Foi utilizada energia de 50 volts no cone e de 3 kilovolts no capilar. As análises *offline* foram conduzidas por injeção direta das amostras, utilizando uma bomba de infusão (KDScientific) a um fluxo de 5 µL/min e as análises *online* foram realizadas utilizando o UHPLC como sistema de injeção. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5.

#### 4.10.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN da fração AE-DCQ e das frações polissacarídicas obtidas em todas as etapas de fracionamento foram realizadas em espectrômetro Bruker-Avance III (400 MHz), utilizando sonda inversa de 5 mm de diâmetro. As frações polissacarídicas foram analisadas na temperatura de 50 °C, em D<sub>2</sub>O, utilizando acetona como padrão interno (30.2/2.22, <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H). Já a fração AE-DCQ foi analisada em temperatura ambiente, utilizando Metanol-D<sub>4</sub> como solvente e padrão interno (49.15/3.35, <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H). Experimentos unidimensionais de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H e DEPT-135 foram realizados juntamente com experimentos 2D, homo- e heteronucleares, como COSY (RMN de <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H) e HSQC (RMN de <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H).

#### 4.10.6 Dosagem de ácidos urônicos pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991)

A dosagem de ácidos urônicos totais foi realizada para as frações contendo polissacarídeos, por método colorimétrico. Em 400 µL de amostra (0,1 mg/mL) adicionaram-se 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6), e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio (75 mmol/L em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A solução foi agitada em vortex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após

o resfriamento dos tubos em banho de gelo, foram adicionados 80  $\mu$ L de *m*-hidroxibifenila (0,15%, p/v, em NaOH 0,5%, p/v) e os tubos foram agitados novamente em vortex. A presença de ácidos urônicos foi visualizada pelo aparecimento de uma coloração rósea.

A coloração, estável até 1 hora após sua formação, foi imediatamente lida em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) em 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido galacturônico, com concentrações dentro da faixa de sensibilidade do método (0,97 a 38,8 mg de ácido urônico).

#### 4.10.7 Teste de homogeneidade e determinação da massa molar

A determinação da homogeneidade de amostras de polissacarídeos foi realizada por cromatografia de exclusão estérica de alta *performance* (HPSEC – *high performance size exclusion chromatography*). As análises foram realizadas no aparelho da Wyatt Technology, equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alta *performance*, com quatro colunas de gel permeação com limites de exclusão de  $7 \cdot 10^6$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^4$  e  $5 \cdot 10^3$  (WATERS). A detecção foi realizada por meio do detector de índice de refração (RID – *refractive index detector*) modelo Waters 2410. Os resultados foram obtidos com o software ASTRA 4.70.07.

O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 0,1 M e azida ( $\text{NaN}_3$ ) 0,2 g/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min. As amostras de polissacarídeos foram solubilizadas para concentração final de 1 mg/mL na mesma solução utilizada como eluente. Após a solubilização, as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22  $\mu$ m. O volume de injeção de amostra no equipamento foi de 100  $\mu$ L.

A obtenção da massa molar dos polissacarídeos das frações AEF30, ARF30 e BEF30 (amostras que apresentarem um perfil homogêneo de eluição) foi realizada neste mesmo equipamento. Determinou-se a taxa de variação do índice de refração com relação à concentração ( $dn/dc$ ) destas amostras. As amostras foram solubilizadas na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL, e filtradas através de membrana de acetato de celulose com diâmetro médio dos poros de 0,45  $\mu$ m. As amostras foram diluídas para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL e analisadas utilizando-se apenas o detector de índice de

refração, com as colunas desacopladas. O fluxo do solvente foi de 0,1 mL/min, uma quantidade de 100 µL de amostra foi injetada no equipamento e os resultados foram obtidos com o *software* ASTRA 4.70.07.

#### 4.11 ATIVIDADES BIOLÓGICAS PROMOVIDAS PELOS EXTRATOS DE *A. lappa*

Todos os testes de atividades biológicas promovidas pela planta *A. lappa* foram realizados no Departamento de Farmacologia da UFPR. O teste de atividade antiúlcera gástrica de frações contendo metabólitos secundários foi realizado pela aluna de doutorado Luisa Mota da Silva, sob orientação da professora Dra. Maria Fernanda de Paula Werner. Os testes de atividade antiúlcera gástrica e de atividade anti-inflamatória de frações contendo polissacarídeos foram realizados pela professora Dra. Cristiane Hatsuko Baggio e pela aluna de mestrado Daniele Maria Ferreira.

##### 4.11.1 Atividade antiúlcera gástrica

###### 4.11.1.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizadas ratas Wistar com peso variando entre 180 a 200 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e pelo TECPAR e foram mantidos sob condição padrão laboratorial (ciclo de 12 h dia/noite e temperatura de  $23 \pm 2$  °C). As ratas permaneceram em jejum sólido por 15 a 18 h antes da realização dos experimentos.

A metodologia empregada para os experimentos com animais foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso Animal Institucional da UFPR (número 500 para os experimentos com metabólitos secundários e número 657 para os experimentos com polissacarídeos).

###### 4.11.1.2 Indução de lesão gástrica aguda em ratos

Ratas em jejum ( $n = 6 - 8$ ) foram tratados oralmente com veículo (água, 0,1 mL/100 g de peso corpóreo), omeprazol (40 mg/kg), frações contendo polissacarídeos (ASAA) ou metabólitos secundários (FSE, FSE-C, FSE-AE, FSE-B e

FSE-AQ) em diferentes doses, 1 h antes da administração de etanol PA (0,5 mL/200 g). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 1 h após o tratamento com etanol. Para determinar a extensão da lesão gástrica o estômago foi removido, aberto, fotografado e as lesões gástricas foram mensuradas em mm<sup>2</sup> por planimetria computadorizada usando o software Image Tool 3.0.

#### 4.11.2 Atividade anti-inflamatória

##### 4.11.2.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss adultos (25 a 35 g), fêmeas, mantidos em temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C), ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com água e ração *ad libitum*. Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da UFPR, sob o número 657.

##### 4.11.2.2 Indução de edema de pata pela injeção intraplantar de carragenina

Camundongos (n = 6 a 8) tiveram a espessura de sua pata posterior direita medida através de um micrômetro (basal) e, em seguida, foram tratados pela via intraperitoneal com veículo (salina) na dose de 0,1 mL/10 g, dexametasona na dose de 0,5 mg/kg ou frações contendo polissacarídeos, sendo que as frações testadas foram: ASAA nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg e ARF50, ARF30 e AEF30 nas doses de 7,7, 4,9 e 18,4 mg/kg, respectivamente. Após 30 minutos, foram administrados 20 µL de carragenina (300 µg/pata) na pata posterior direita dos animais. A evolução do edema de pata induzido pela carragenina foi monitorado por 72 h, e os resultados foram expressos em mm.

##### 4.11.3 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias (n = 6-8) exceto os valores de DE<sub>50</sub> (dose efetiva 50%), os quais estão apresentados como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. A significância estatística foi determinada usando

análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Em todos os casos, foi considerada diferença significativa quando  $p < 0,05$ . A  $DE_{50}$  foi determinada por regressão não linear usando o *software* Graph-Pad (GraphPad software, San Diego, CA, USA), versão 4.03.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE POLISSACARÍDEOS

A obtenção de polissacarídeos das folhas secas e moídas de *A. lappa* foi realizada por extrações aquosas e alcalinas, seguidas de várias etapas de fracionamento, as quais estão mostradas resumidamente nas FIGURAS 8 e 9.

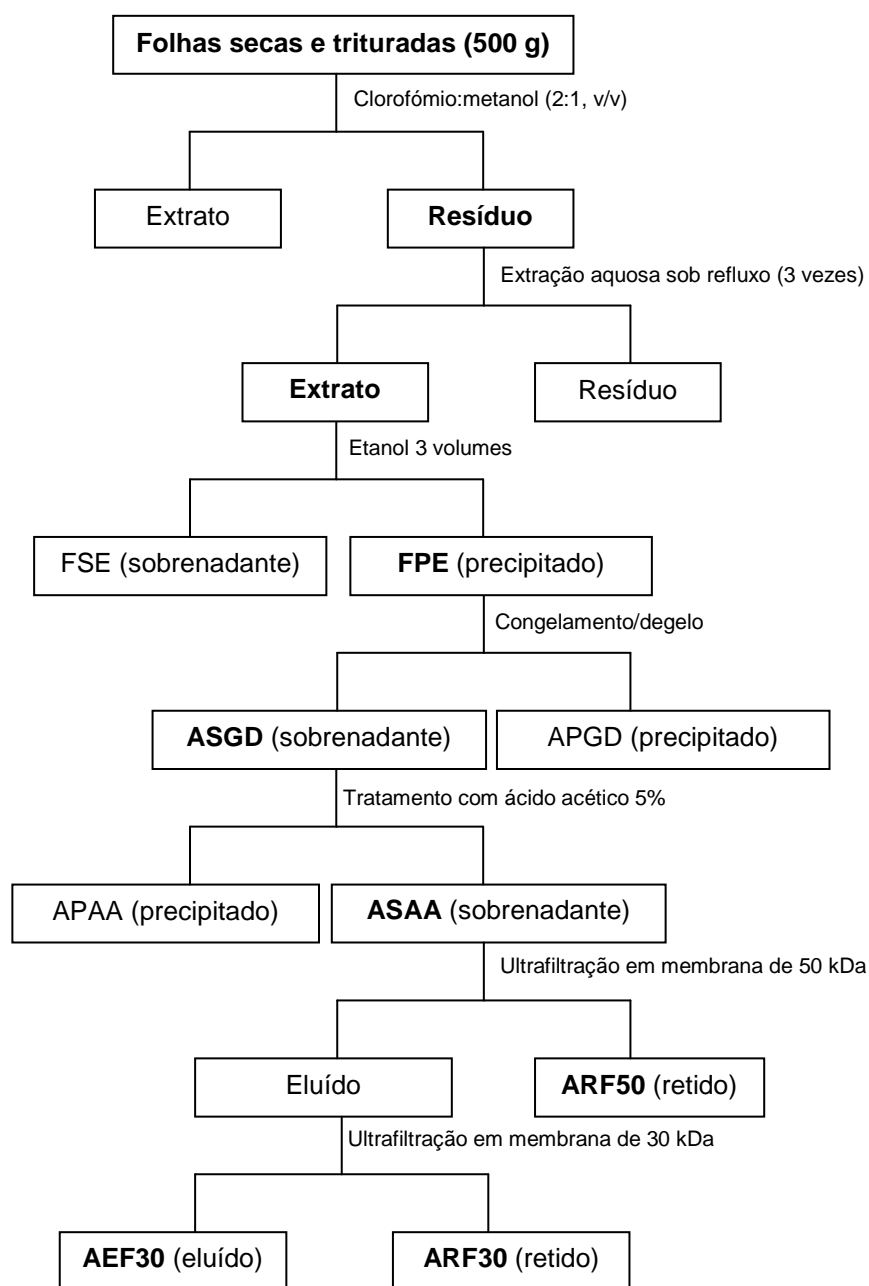


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO AQUOSA E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS.



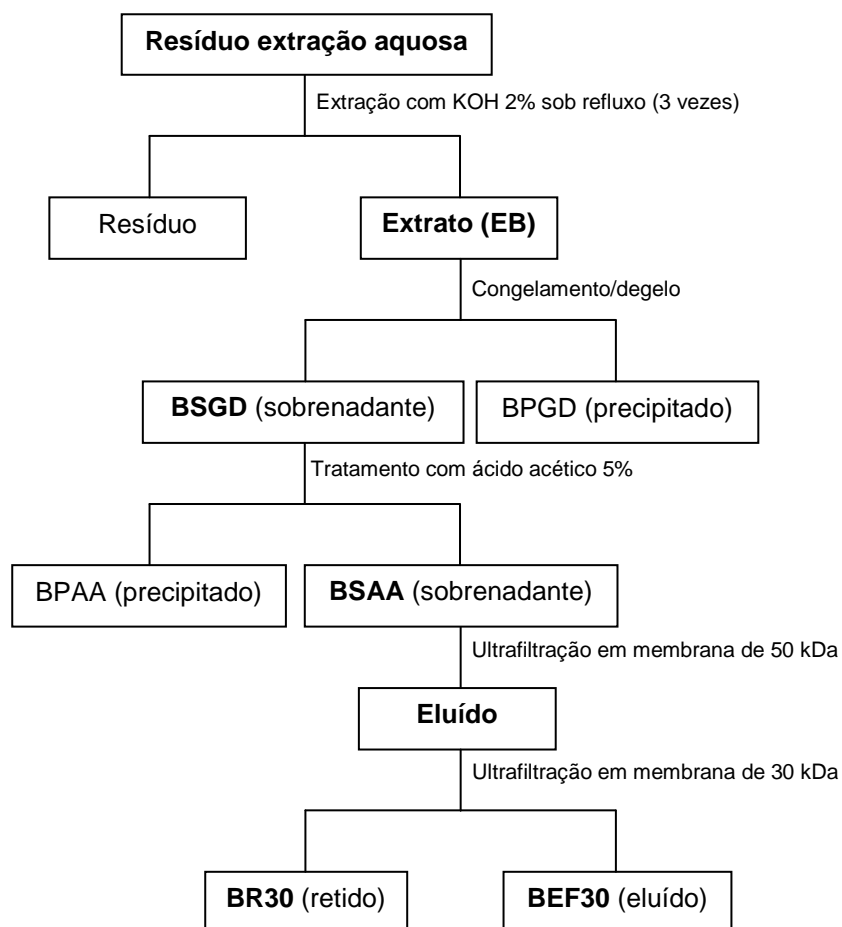


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO ALCALINA E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS.

Após a extração aquosa, os componentes de alta massa molar foram separados dos de baixa massa por tratamento com etanol, o qual deu origem a um precipitado contendo os polissacarídeos. O material residual da extração aquosa foi submetido à extração alcalina, originando um extrato alcalino bruto, que também apresentou polissacarídeos em sua composição. Os polissacarídeos dos dois extratos acima descritos foram submetidos a vários processos de purificação.

Inicialmente realizou-se o procedimento de congelamento e degelo das frações FPE e EB, o qual deu origem a frações solúveis e insolúveis em água fria. As frações solúveis ASGD e BSGD foram analisadas quanto a seu perfil de eluição em cromatografia de exclusão estérica de alta *performance*, sendo evidenciado um perfil de eluição heterogêneo para ambas (FIGURA 10).

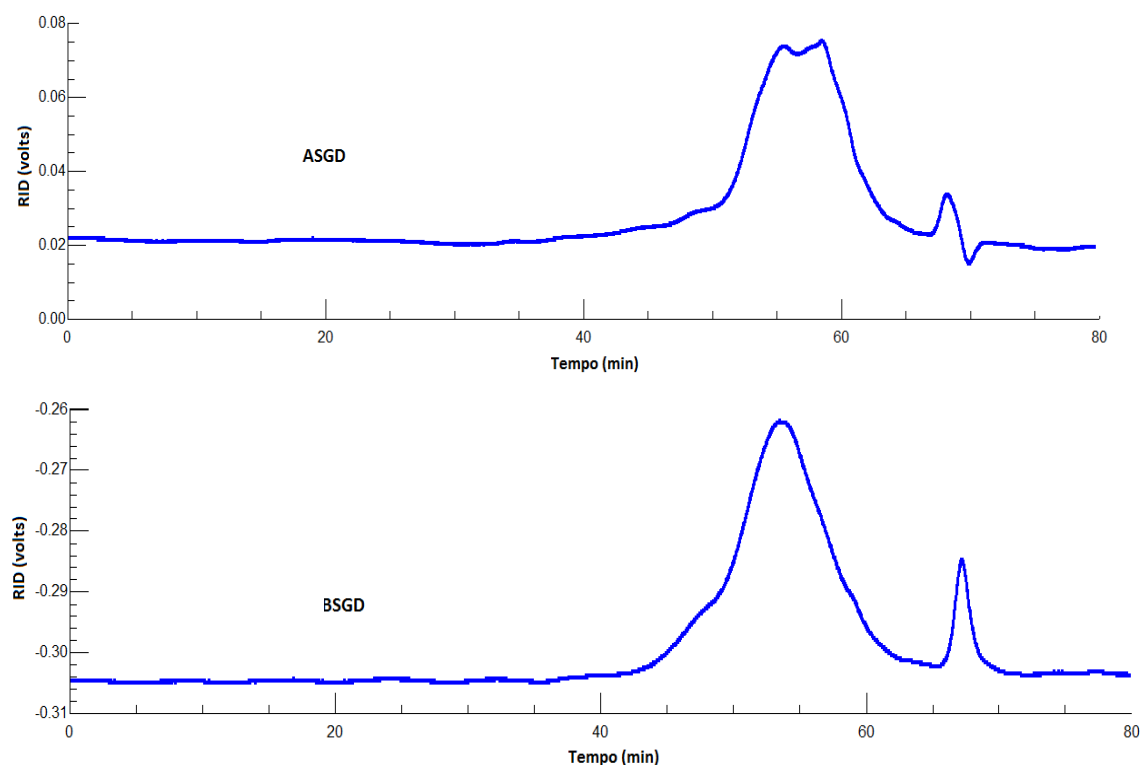


FIGURA 10 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES ASDG E BSGD, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

As frações solúveis em água fria oriundas dos extratos aquoso (ASGD) e alcalino (BSGD) foram submetidas à posterior acidificação do meio com ácido acético, processo este que gerou um precipitado e um sobrenadante. Os sobrenadantes, denominados ASAA (aquoso) e BSAA (alcalino), em análise do perfil de eluição por HPSEC apresentaram um pico principal próximo a 55 min e outro menor próximo a 50 min (FIGURA 11). Isso pode representar a presença de diferentes polissacarídeos nestas frações ou, simplesmente, uma mistura de frações do mesmo polissacarídeo, mas com massas molares diferentes.

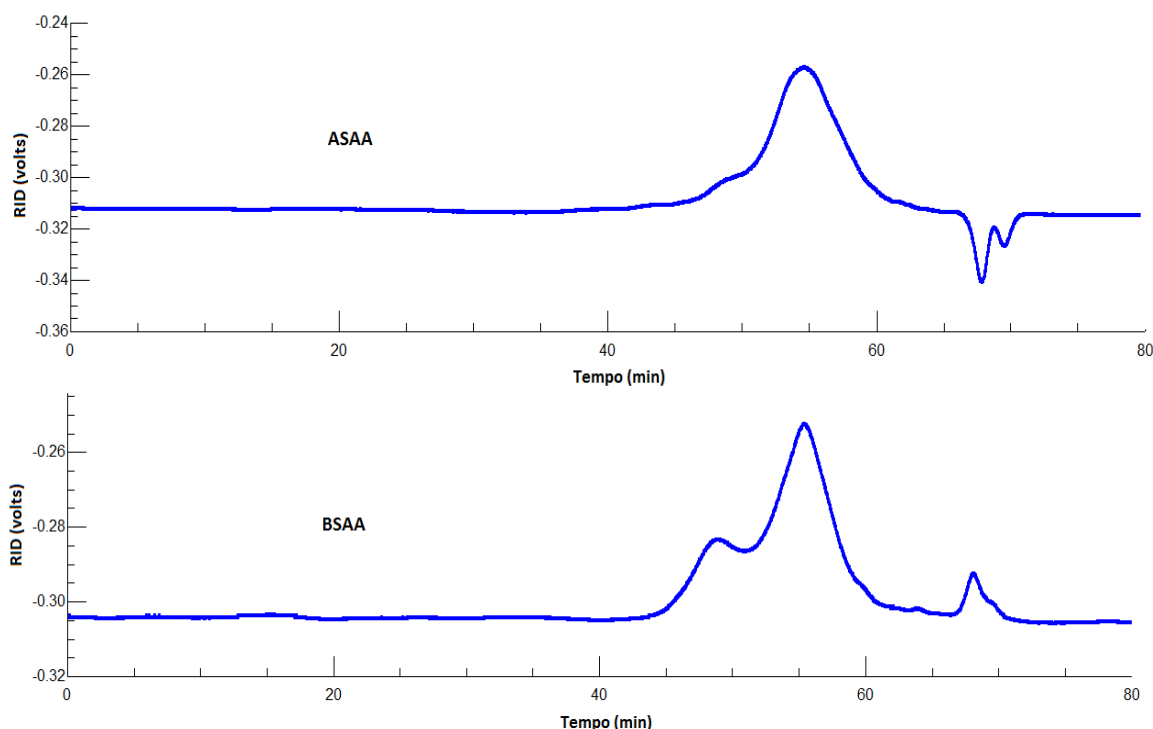


FIGURA 11 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES ASAA E BSAA, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

As frações ASAA e BSAA foram submetidas, por sua vez, à ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 50 kDa, sendo que a fração ASAA originou uma fração retida (ARF50) e outra eluída nesta membrana, enquanto que a fração BSAA eluiu completamente. As frações eluídas foram submetidas a uma nova filtração utilizando membrana com limite de exclusão de 30 kDa, gerando frações retidas e eluídas para as amostras oriundas de ambos os extratos. As frações obtidas foram analisadas quanto a seu perfil de eluição em cromatografia de exclusão estérica de alta *performance* (FIGURA 12). É possível observar que duas das frações obtidas a partir da fração ASAA, frações ARF30 e AEF30, apresentaram perfil de eluição homogêneo, com  $M_w = 91.000 \text{ g/mol}$  ( $dn/dc = 0,150$ ) e  $M_w = 65.000 \text{ g/mol}$  ( $dn/dc = 0,165$ ), respectivamente. Em relação às frações oriundas da fração BSAA (FIGURA 13), apenas a fração BEF30 apresentou perfil de eluição homogêneo, com  $M_w = 33.500 \text{ g/mol}$  ( $dn/dc = 0,175$ ). A TABELA 1 apresenta o rendimento de todas as frações obtidas no processo de extração e fracionamento de polissacarídeos.

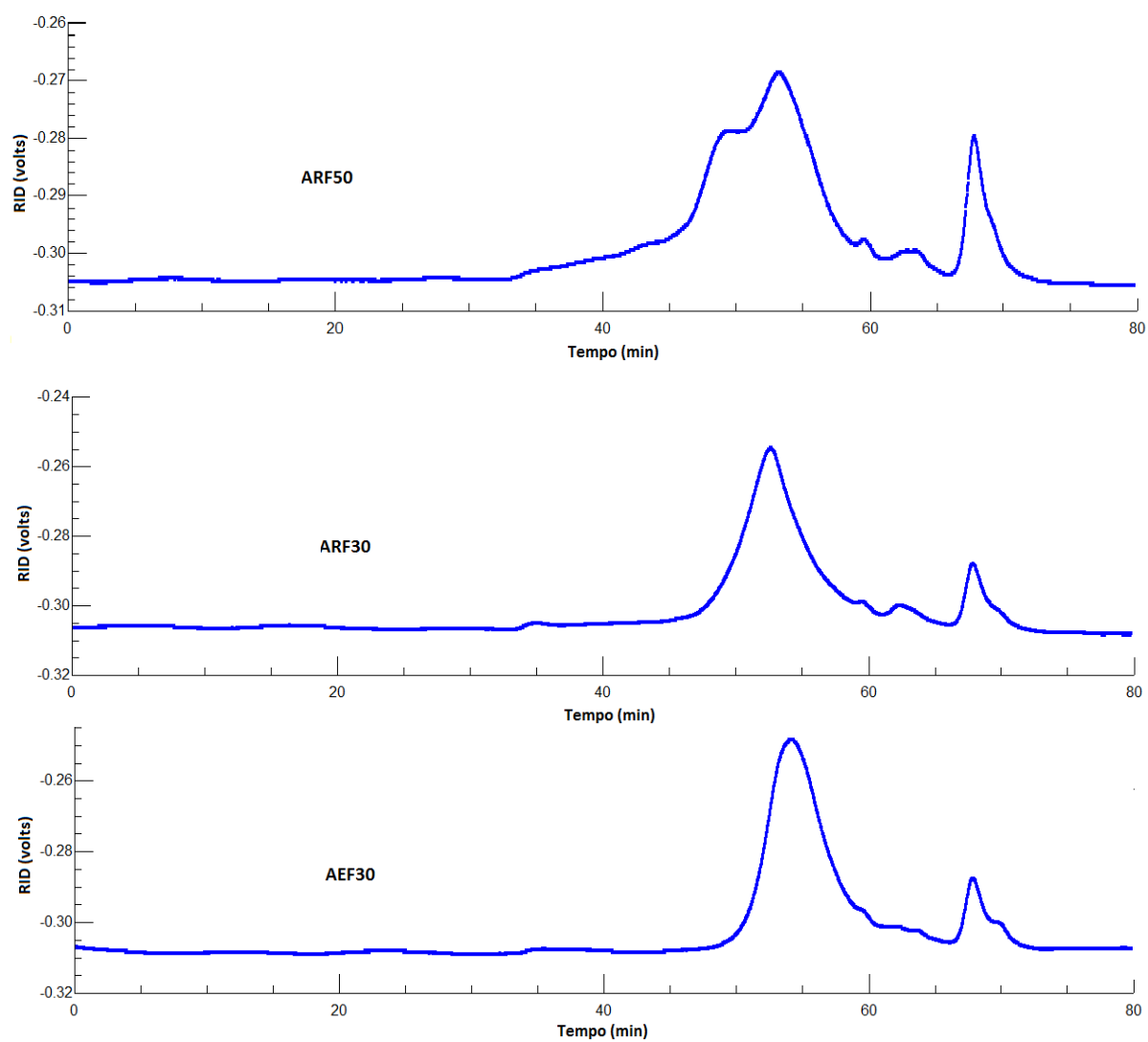


FIGURA 12 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES ARF50, ARF30 E AEF30, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

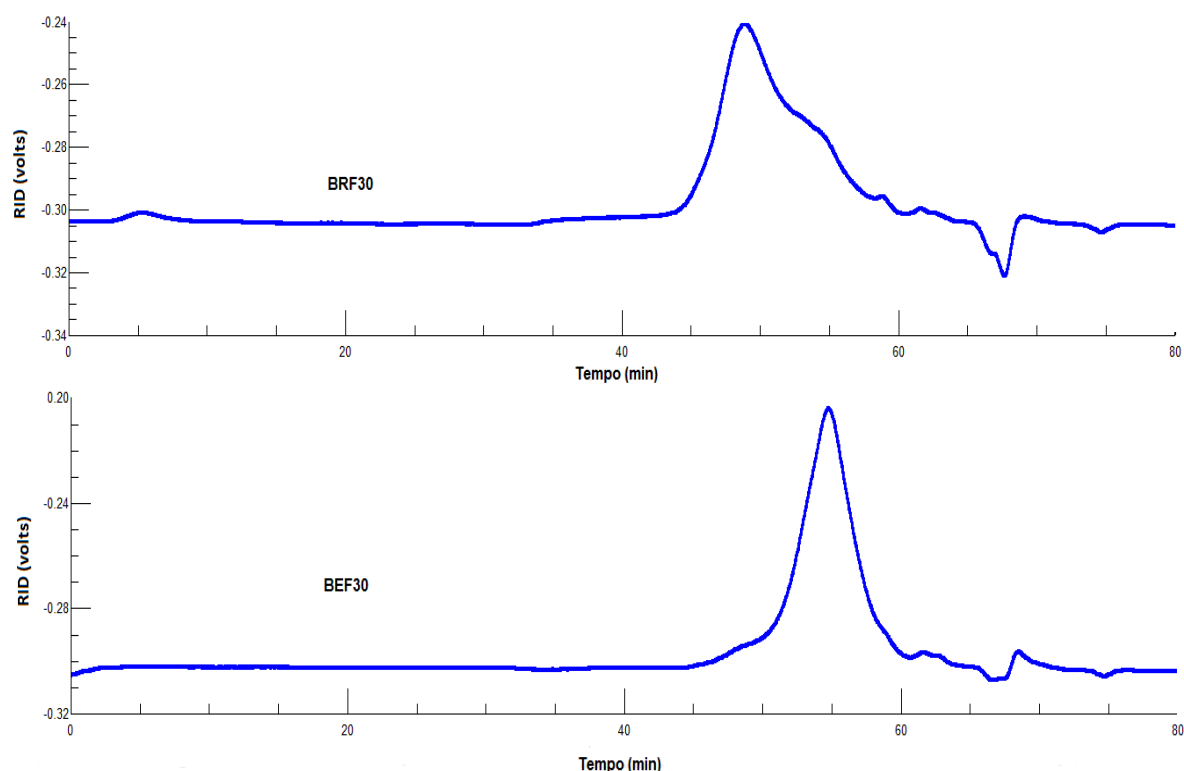


FIGURA 13 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES BRF30 E BEF30, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID).

TABELA 1 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DERIVADAS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA DE *A. lappa*.

Frações	Rendimento <sup>(1)</sup>	
	(g)	(%)
FPE	13,19	2,64
FSE	48,23	9,65
ASGD	6,11	1,22
APGD	4,40	0,88
ASAA	2,55	0,51
APAA	0,69	0,14
ARF50	0,48	0,10
ARF30	0,31	0,06
AEF30	1,15	0,23
EB	57,53	11,51
BSGD <sup>(2)</sup>	6,57	1,31
BPGD	19,77	3,95
BSAA	2,33	0,47
BPAA	4,01	0,80
BRF30	0,74	0,15
BEF30	1,42	0,28

NOTAS: <sup>(1)</sup> Rendimento baseado em 500 g de folhas secas e moídas. <sup>(2)</sup> Parte do material foi perdida durante o procedimento de fracionamento.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS

### 5.2.1 Análises de composição monossacarídica e RMN de $^{13}\text{C}$

As frações obtidas durante o processo de fracionamento dos polissacarídeos foram analisadas comparativamente quanto à sua composição monossacarídica (TABELA 2). Os açúcares neutros foram quantificados na forma de alditóis acetato por GC-MS, e os açúcares ácidos pelo método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). A caracterização do tipo de ácido urônico presente nas frações oriundas dos extratos aquoso e alcalino foi realizada por meio de TLC, utilizando padrões de GalA e GlcA como referências (FIGURA 14). Uma vez que foi demonstrado que apenas GalA está presente nas frações ASGD e BSGD, a caracterização do ácido urônico presente nas frações posteriores, derivadas das mesmas, não foi necessária.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DAS EXTRAÇÕES AQUOSA E ALCALINA DAS FOLHAS DE *A. lappa*

Frações	Monossacarídeos (%)								
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA <sup>(1)</sup>
FPE	3,8	1,7	5,9	25,7	3,1	8,0	29,1	14,8	7,9
APGD	13,4	-	-	20,3	-	-	12,0	51,7	2,6
ASGD	3,5	1,6	0,8	20,2	1,9	5,6	22,4	7,0	37,0
APAA	3,1	-	-	23,4	2,6	8,3	25,5	16,9	20,2
ASAA	5,6	1,5	-	12,9	1,7	6,1	25,5	10,7	36,0
ARF50	2,6	0,6	-	17,3	0,3	5,6	36,1	4,9	32,6
ARF30	9,9	1,3	-	15,6	0,6	7,9	31,6	12,1	21,0
AEF30	8,8	6,3	-	12,3	2,3	5,1	24,1	11,1	30,0
EB	15,4	-	-	20,9	-	5,8	36,7	14,3	6,9
BPGD	12,6	-	-	28,0	4,5	3,1	15,1	29,5	7,2
BSGD	6,3	1,4	-	36,6	4,2	2,1	33,3	5,9	10,2
BPAA	-	-	-	59,1	8,8	-	15,3	8,7	8,1
BSAA	5,1	1,1	-	27,6	5,7	2,3	31,4	3,5	23,3
BRF30	20,6	5,0	-	16,6	1,2	1,2	21,6	1,7	32,1
BEF30	3,4	-	-	41,1	7,2	-	15,6	11,9	20,8

NOTAS: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. <sup>(1)</sup> Determinação de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Rha (ramnose), Fuc (fucose), Ara (arabinose), Xyl (xilose), Man (manose), Gal (galactose), Glc (glucose), GalA (ácido galacturônico).

Pela análise da Tabela 2, pode-se observar que após as etapas de fracionamento por congelamento e degelo e de precipitação em meio ácido, as amostras referentes aos sobrenadantes obtidos nestes processos (ASGD, BSGD, ASAA e BSAA) mostraram um maior teor de GalA quando comparadas aos precipitados (APGD, BPGD, APAA e BPAA), indicando que polissacarídeos pécticos ficaram concentrados nas frações sobrenadantes. As referidas frações precipitadas não foram analisadas quanto à estrutura dos polissacarídeos presentes, pois apresentaram dificuldade quanto à sua solubilização para as análises posteriores.



FIGURA 14 – TLC DAS AMOSTRAS ASGD, APGD, BSGD E BPGD APÓS HIDRÓLISE (TFA 2 M, 8 h A 100 °C).

NOTAS: P1 refere-se aos padrões de ramnose, arabinose, galactose e ácido galacturônico e P2 refere-se aos padrões de xilose, glucose e ácido glucurônico (de cima para baixo). Arabinose e galactose aparecem em uma única banda. As bandas destacadas referem-se ao ácido galacturônico. Fase móvel: 1-propanol:água (7:3). Revelador: orcinol-ácido sulfúrico a 100 °C.

Os principais monossacarídeos encontrados nas frações ASAA, BSAA foram arabinose, galactose, glucose e ácido galacturônico. Os altos teores de GalA sugerem a presença de homogalacturonanas e/ou ramnogalacturonanas, uma vez que ramnose também está presente nas frações. Já os altos teores de Ara e Gal

sugerem a presença de uma arabinogalactana. As arabinogalactanas são polissacarídeos frequentemente associados às ramnoglacturonanas, por meio de uma ligação glicosídica entre a cadeia de galactose da arabinogalactana com uma unidade de ramnose da ramnoglacturonana (CARPITA E GIBEAUT, 1993). Ramnoglacturonanas e arabinogalactanas são tipos de polissacarídeos pécticos facilmente extraídos com água e soluções levemente alcalinas. A glucose presente na composição monossacarídica destas frações pode ser derivada de amido.

Análise comparativa das amostras ASAA e BSAA foi realizada por RMN de  $^{13}\text{C}$ , sendo que os respectivos espectros estão mostrados na FIGURA 15. As duas frações analisadas apresentaram sinais característicos de polissacarídeos. Estes sinais são visualizados nas regiões entre  $\delta$  98 a 110 e  $\delta$  60 a 85, as quais correspondem às regiões de carbono anomérico e demais carbonos do anel ligados a grupos OH, respectivamente.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração ASAA apresentou-se bastante complexo, com muitos sinais na região anomérica ( $\delta$  99,3 a 109,1). Os sinais observados em  $\delta$  109,1 e 107,1 correspondem ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -L-Araf e aquele em  $\delta$  103,3 ao C-1 de unidades de  $\beta$ -D-Galp. Estes sinais são comumente observados em arabinogalactanas (DELGOBO *et al.*, 1998; CIPRIANI *et al.*, 2006, 2009a). Os sinais em  $\delta$  99,3 e 100,2 correspondem ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -D-GalpA não metil-esterificadas e metil-esterificadas, respectivamente (RENARD *et al.*, 1998). Além disso, sinais típicos de  $-\text{CO}_2\text{H}$  e  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$  de GalA ( $\delta$  175,2 e 170,8, respectivamente) e C-6 de Rha ( $\delta$  16,7) também foram observados (RENARD *et al.*, 1998; POPOV *et al.*, 2011). O sinal do grupo metil-éster presente nas unidades de GalA ( $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ) foi visualizado em  $\delta$  52,8 (POPOV *et al.*, 2011).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração BSAA também apresentou sinais correspondentes ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -L-Araf em  $\delta$  108,9 e 107,5, e ao C-1 de unidades de  $\beta$ -D-Galp em  $\delta$  103,3 (DELGOBO *et al.*, 1998; CIPRIANI *et al.*, 2006, 2009). Os sinais em  $\delta$  98,3 e 175 correspondem ao C-1 e C-6 de unidades de  $\alpha$ -D-GalpA, respectivamente, e o sinal em  $\delta$  16,6, ao C-6 das unidades de Rha (RENARD *et al.*, 1998). Sinais referentes a  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$  e  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$  de unidades de GalA não foram observados, uma vez que o meio alcalino, utilizado no momento da extração dos polissacarídeos, remove os grupamentos metil-éster. Diferente do que ocorre com a ASAA, esta fração apresenta uma maior quantidade de arabinose (Tabela 2).



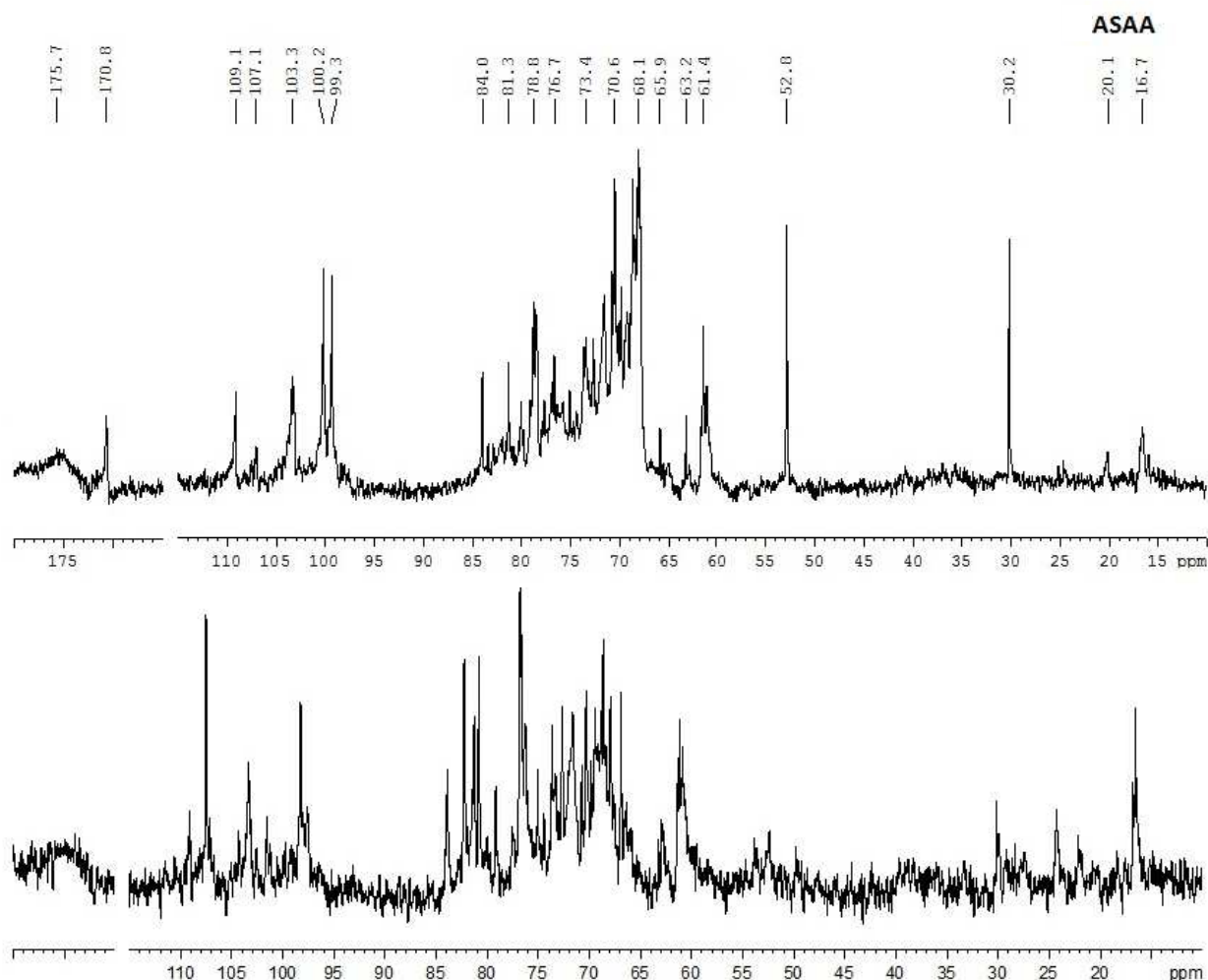


FIGURA 15 – ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES ASAA e BSAA.

NOTAS: Experimentos realizados em  $\text{D}_2\text{O}$ , a  $50^\circ\text{C}$ , com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm.

As frações obtidas a partir de ultrafiltração das frações ASAA e BSAA apresentaram ainda arabinose, galactose, glucose e ácido galacturônico como principais monossacarídeos (Tabela 2). Desta forma, a ultrafiltração parece ter fracionado polissacarídeos semelhantes, mas com diferentes massas molares.

A presença de altos teores de ácido galacturônico nas frações sugere a presença de homogalacturonanas. As unidades de ramnose podem estar presentes intercalando unidades de ácido galacturônico, formando ramnogalacturonanas tipo I (RGI). Segundo CARPITA e McCANN (2000), as RGI podem ser constituídas por longos segmentos de  $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$ , eventualmente interrompidos por unidades de  $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow]$ . E, as unidades de arabinose e galactose

provavelmente fazem parte de polissacarídeos neutros que ramificam a RGI. A ramificação das RGI por polissacarídeos neutros frequentemente ocorre na posição O-4 de algumas unidades de ramnose (CARPITA e McCANN, 2000).

Embora a composição monossacarídica seja semelhante entre as frações, a fração ARF50 apresenta uma relação de ramnose/ácido galacturônico menor que as demais, sugerindo que a RGI da fração ARF50 apresenta segmentos maiores constituídos por unidades de ácido galacturônico. Além disso, a fração BEF30 apresenta um teor de arabinose maior que as demais, mostrando que seus polissacarídeos neutros são constituídos majoritariamente por este monossacarídeo.

#### 5.2.2 Análises de metilação e RMN de correlação direta $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ (HSQC)

A análise de metilação das frações ARF50, ARF30, AEF30, BRF30 e BEF30 (TABELA 3) mostrou que as unidades de galactose são principalmente 3-O-, 6-O- e 3,6-di-O-substituídas. Unidades de galactose com este padrão de substituição são encontradas em arabinogalactanas tipo II (ASPINAL, 1973; CARPITA e GIBEAUT, 1993). As unidades de arabinose das frações obtidas a partir da extração alcalina (BRF30 e BEF30) são principalmente 5- e 3,5-di-O-substituídas, enquanto que nas frações obtidas a partir da extração aquosa, as unidades de arabinose aparecem principalmente como terminais não redutores. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados das unidades de ácidos urônicos não são voláteis e, por isso, não podem ser analisados por GC-MS. Desta forma, para confirmar o tipo de ligação presente entre as unidades de ácido galacturônico, a fração ARF30 foi submetida ao processo de carboxirredução.

Após a carboxirredução, as unidades de GalA presentes no polissacarídeo são convertidas em Gal e, desta forma, podem ser analisadas. Além disso, as ligações glicosídicas envolvendo unidades de ácidos urônicos são mais resistentes à hidrólise. Por este motivo, o teor de ramnose pode aumentar nas amostras carboxirreduzidas. A fração ARF30 carboxirreduzida apresentou um aumento no teor do derivado metilado 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Gal (12,4%) em relação à fração nativa (3%). Este resultado demonstra que as unidades de ácido galacturônico são 4-O-substituídas. Além disso, a fração carboxirreduzida apresentou um aumento no teor dos derivados metilados 3,4-Me<sub>2</sub>-Rha (4,9%) e 3-Me-Rha (2,8%) em relação à amostra nativa, que apresentou 1,8% do derivado 3,4-Me<sub>2</sub>-Rha e que não havia apresentado o derivado

3-Me-Rha, demonstrando assim que unidades de ramnose são 2-O- e 2,4-di-O-substituídas. Como discutido acima, este padrão de substituição nas unidades de ácido galacturônico e nas unidades de ramnose é encontrado em RGI (CARPITA e McCANN, 2000).

TABELA 3 – ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE BRF30, BEF30, ARF50, ARF30 E AEF30.

tR <sup>(1)</sup>	Derivado metilado	Tipo de ligação	BRF30	BEF30	ARF50	ARF30	AEF30
0,81	2,3,5-Me <sub>3</sub> -Ara	Terminal	6,0	6,6	7,2	6,6	4,2
0,87	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Rha	Terminal	-	-	-	-	3,6
0,94	3,5-Me <sub>2</sub> -Ara	→)2-	-	3,5	-	-	-
0,96	3,4-Me <sub>2</sub> -Rha	→)2-	1,8	1,6	-	1,8	1,8
0,97	2,5-Me <sub>2</sub> -Ara	→)3-	4,0	4,7	3,0	3,9	2,5
0,97	2,3-Me <sub>2</sub> -Rha	→)4-	-	-	-	-	3,3
0,98	2,4-Me <sub>2</sub> -Rha	→)3-	-	-	-	-	3,5
1,00	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	Terminal	-	2,8	-	4,3	3,7
1,03	2,3-Me <sub>2</sub> -Ara	→)5-	13,0	9,9	2,7	2,8	1,9
1,05	2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	Terminal	5,5	6,0	5,3	7,6	6,9
1,07	2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	→)4-	3,9	9,0	-	-	-
1,14	2-Me-Rha	→)3,4-	-	-	-	2,3	4,1
1,20	3-Me-Rha	→)2,4	3,3	3,2	2,0	-	-
1,23	3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	→)2-	-	-	4,8	6,0	4,2
1,25	2-Me-Ara	→)3,5-	9,8	5,8	-	2,3	-
1,29	2,4,6-Me <sub>3</sub> -Gal	→)3-	5,4	2,9	9,1	7,8	7,0
1,32	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Gal	→)4-	2,7	2,2	2,2	3,0	2,6
1,33	3-Me-Ara	→)3,5-	-	2,7	-	-	-
1,35	2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	→)4-	-	3,3	3,0	8,0	9,0
1,50	2,3,4-Me <sub>3</sub> -Gal	→)6-	5,1	6,6	3,4	4,1	2,3
1,53	2,6-Me <sub>2</sub> -Man	→)3,4-	-	-	-	2,5	-
1,57	2,6-Me <sub>2</sub> -Gal	→)3,4-	-	-	2,9	2,5	3,9
1,87	2,3-Me <sub>2</sub> -Man	→)4,6-	-	-	2,3	2,3	1,7
2,02	2,4-Me <sub>2</sub> -Gal	→)3,6-	7,3	8,4	12,0	7,4	3,7
2,31	2-Me-Gal	→)3,4,6-	-	-	7,5	3,8	-
GalA <sup>(2)</sup>			32,2	20,8	32,6	21	30,1

NOTAS: <sup>(1)</sup> tR = tempo de retenção relativo ao do 2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol; <sup>(2)</sup> determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

Análise de RMN de correlação direta  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HSQC) foi realizada para as frações ARF50, ARF30, AEF30, BRF30 e BEF30. Por esta análise, as frações derivadas da extração aquosa apresentaram-se semelhantes entre si, assim como as frações derivadas da extração alcalina. Na FIGURA 16 podem ser visualizados os mapas de correlação direta  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  das frações ARF30 e BRF30.

Na região de carbono anomérico da fração ARF30, os principais sinais visualizados aparecem em  $\delta$  109,5/5,26 relativos ao C-1/H-1 de unidades de  $\alpha$ -L-Araf, em  $\delta$  103,3/4,47 e 104,2/4,65 relativos ao C-1/H-1 de unidades de  $\beta$ -D-Galp, em  $\delta$  100,4/4,96 e 99,5/5,12 relativos ao C-1/H-1 de unidades de  $\alpha$ -D-GalpA metil-esterificadas e não metil-esterificadas, respectivamente, e em  $\delta$  99,5/5,00 relativo ao C-1/H-1 de unidades de  $\alpha$ -L-Rhap (DELGOBO *et al.*, 1998; RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011).

A presença de unidades de  $\alpha$ -D-GalpA 4-O-substituídas foi confirmada pelo sinal em  $\delta$  79,0/4,45. O sinal do grupo  $-\text{CH}_3$  das unidades  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-GalpA-6-OMe (1 $\rightarrow$  aparece em  $\delta$  53,1/3,81, o C-5/H-5 das unidades de  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-GalpA-6-OMe (1 $\rightarrow$  aparecem em  $\delta$  70,7/5,12 e 70,8/5,06, enquanto que o sinal de C-5/H-5 das unidades  $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -D-GalpA-(1 $\rightarrow$  aparece em  $\delta$  71,8/4,73. Os sinais de C-2/H-2, C-4/H-4 e C-6/H-6 das unidades de  $\alpha$ -L-Rhap 2,4-di-O-substituídas são visualizados em  $\delta$  76,3/4,12, 81,2/3,87 e 16,8/1,25, respectivamente (RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011). Estes resultados estão de acordo com o resultado obtido na análise de metilação, novamente sugerindo a presença de uma RG I.

Em  $\delta$  82,2/3,89 pode ser observado o sinal de C-3/H-3 das unidades de  $\beta$ -D-Galp 3-O-substituídas (DELGOBO *et al.*, 1998). Embora, de acordo com a análise de metilação, algumas unidades de  $\beta$ -D-Galp são 6-O-substituídas, o sinal de C-6/H-6 destas unidades não foi observado no HSQC da fração ARF30.

Na fração BRF30 os principais sinais observados na região de carbono anomérico apresentaram  $\delta$  108,8/5,26, 107,5/5,08 e 107,3/5,14 relativos ao C-1/H-1 de unidades de  $\alpha$ -L-Araf,  $\delta$  103,0/4,45 e 103,7/4,63 relativos ao C-1/H-1 de unidades de  $\beta$ -D-Galp,  $\delta$  98,3/5,05 relativo ao C-1/H-1 de unidades de  $\beta$ -D-GalpA não metil-esterificadas e  $\delta$  97,7/5,29 relativo ao C-1/H-1 de unidades de  $\alpha$ -L-Rhap (DELGOBO *et al.*, 1998; RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011).

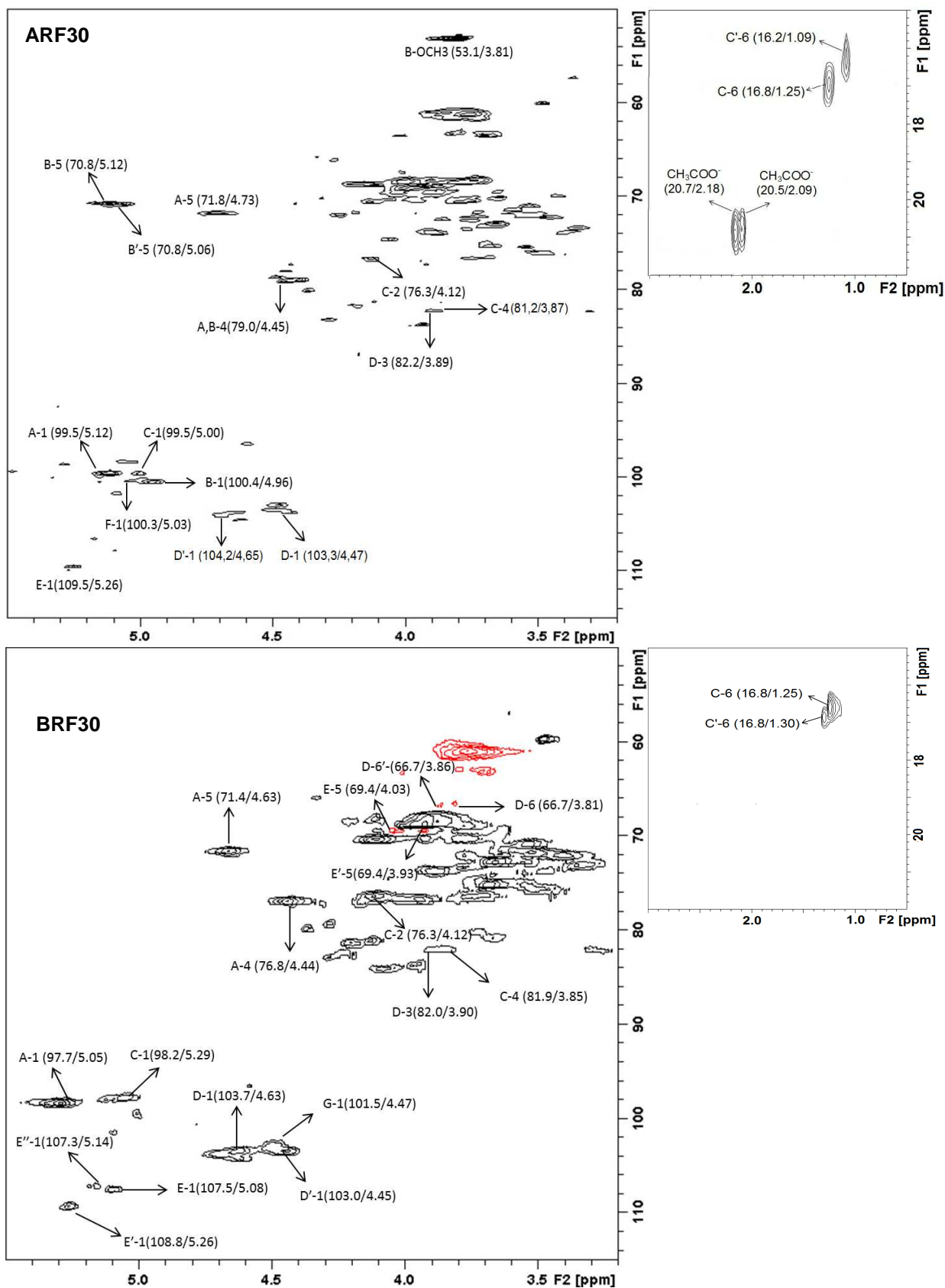


FIGURA 16 – MAPAS DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HSQC) DAS FRAÇÕES ARF30 E BRF30. NOTAS: Experimentos realizados em  $\text{D}_2\text{O}$ , a  $50^\circ\text{C}$ , com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm. A ( $\alpha$ -D-GalpA); B, B' (6-OMe- $\alpha$ -D-GalpA); C ( $\alpha$ -L-Rhap); D, D' ( $\beta$ -D-Galp); E, E', E'' ( $\alpha$ -L-Araf); F ( $\alpha$ -D-Glcp) E G (Xyl). Sinais em vermelho representam  $-\text{CH}_2-$  no HSQC-DEPT.

A presença de ácidos galacturônicos 4-O-substituídos foi confirmada pelo sinal em  $\delta$  76,8/4,44. Unidades de  $\alpha$ -D-GalpA metil-esterificadas [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA-6-OMe-(1 $\rightarrow$ )] não estão presentes nas frações obtidas a partir da extração com KOH 2%, uma vez que o ambiente alcalino remove o grupo metil-éster. Isso também pode ser confirmado pela ausência do sinal em  $\delta$  70,7/5,12, relativo ao C-5/H-5 das unidades de  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpA-6-OMe-(1 $\rightarrow$ ). Sinais de C-2/H-2, C-4/H-4 e C-6/H-6 de unidades de  $\alpha$ -L-Rhap 2,4-di-O-substituídas são visualizados em  $\delta$  76,3/4,12, 81,9/3,85 e 16,9/1,30, respectivamente (RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011). Estes resultados também sugerem a presença de uma RGI nas frações obtidas a partir da extração alcalina.

Em  $\delta$  82,0/3,90 é observado o sinal de C-3/H-3 das unidades de  $\beta$ -D-Galp 3-O-substituídas e, em  $\delta$  66,7/3,81 e 66,7/3,86 são observados sinais de C-6/H-6 das unidades 6-O-substituídas. E, sinais de C-5/H-5 de unidades  $\alpha$ -L-Araf 5-O-substituídas aparecem em  $\delta$  69,4/4,03 e 69,4/3,93 (DELGOBO *et al.*, 1998).

O sinal em  $\delta$  20,7/2,18 e 20,5/2,09 presente na fração ARF30 é característico de  $\text{CH}_3\text{-COO-}$  comumente presente como substituinte nas posições O-2 e/ou O-3 de algumas unidades de ácido galacturônico de RGI (LEROUGE *et al.*, 1993; POPOV *et al.*, 2011). Este sinal não é observado na fração BRF30, uma vez que o meio alcalino do procedimento de extração com KOH 2% remove os grupamentos acetil.

Assim como evidenciado pela análise de metilação, a análise de RMN de  $^{13}\text{C-}^1\text{H}$  (HSQC) confirmou a presença de unidades de ácido galacturônico 4-O-substituídas e de unidades de galactose 3-O- e 6-O-substituídas, as quais são observadas em ramnagalacturonanas tipo I e arabinogalactanas tipo II. Como discutido anteriormente, arabinogalactanas comumente ramificam as RGI em suas unidades de ramnose. Portanto, estas classes de polissacarídeos estão presentes em ARF30 e BRF30, assim como nas outras frações obtidas pelo fracionamento por ultrafiltração em membranas. Desta forma, a ultrafiltração não separou diferentes polissacarídeos, mas gerou frações de diferentes massas molares dos mesmos tipos de polissacarídeos.

### 5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS PROMOVIDAS PELOS EXTRATOS DE *A. lappa*

### 5.3.1 Atividade antiúlcera gástrica da fração ASAA

*Arctium lappa* é uma planta utilizada na medicina popular pelo seu efeito gastroprotetor, efeito este já cientificamente comprovado para o extrato aquoso bruto das folhas desta planta em estudo realizado por CALIXTO *et al.* (2003), sem, no entanto, caracterizar os compostos responsáveis pelo efeito observado. Considerando que a fração ASAA, originária do extrato aquoso das folhas, é composta por ramnogalacturonana tipo I e arabinogalactana tipo II, classes de polissacarídeos que apresentaram efeito antiúlcera gástrica em estudos realizados por Cipriani *et al.* (2006) e Nascimento *et al.* (2013), a referida fração foi também submetida a teste para avaliação deste efeito. Para isso foi utilizado o ensaio de úlcera gástrica induzida por etanol em ratos (FIGURA 17), empregando o omeprazol como controle positivo no teste. Pela análise da figura, pode-se observar a formação de lesões gástricas no grupo controle negativo, e verificar que o tratamento oral dos animais com ASAA (0,3, 3 e 30 mg/kg) não apresentou resultado significativamente diferente daquele apresentado pelo controle negativo, demonstrando assim a inexistência de efeito gastroprotetor da referida fração neste teste. Este resultado indica que pequenas diferenças estruturais entre polissacarídeos podem influenciar no efeito antiúlcera, tendo em vista que arabinogalactanas tipo II e ramnogalacturonanas tipo I mostraram efeito gastroprotetor em trabalhos anteriores (CIPRIANI *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2013).

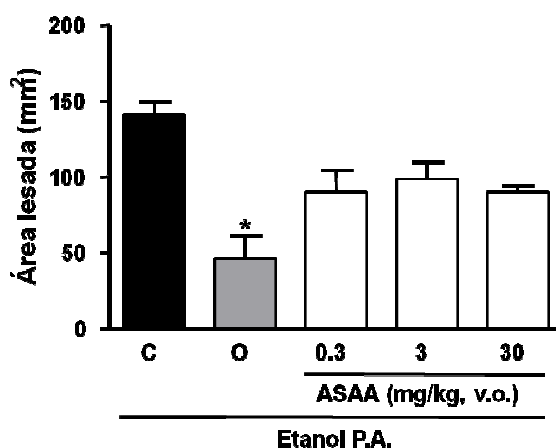


FIGURA 17 – EFEITO DA FRAÇÃO ASAA (0,3, 3 e 30 mg/kg, v.o.) NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.

NOTAS: C: Controle negativo (água, v.o.). O: omeprazol (40 mg/kg,v.o.). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (Anova), seguida pelo teste de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , em relação ao grupo controle negativo.

### 5.3.2 Atividade anti-inflamatória dos polissacarídeos obtidos por extração aquosa

*Arctium lappa* é também utilizada na medicina popular pelo seu efeito anti-inflamatório, mas não há relato na literatura referente ao efeito anti-inflamatório promovido pelas folhas desta planta. Contudo, nas folhas estão presentes polissacarídeos das classes das ramnoglacturonanas tipo I e arabinogalactanas tipo II. Efeito anti-inflamatório promovido por estas classes de polissacarídeos foi descrito por Ovodova *et al.* (2009). Além disso, trabalhos anteriores relataram o efeito anti-inflamatório causado por outras classes de polissacarídeos, incluindo glucanas e fucomannogalactanas (SMIDERLE *et al.*, 2008; CARBONERO *et al.*, 2008).

Desta maneira, a fração ASAA também foi submetida a teste para avaliação deste efeito, o qual foi realizado por meio do ensaio de edema de pata induzido por carragenina, em camundongos. A carragenina é um agente inflamatório que induz a liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de edema. A dexametasona foi utilizada como controle positivo na dose de 0,5 mg/kg (via i.p.) e reduziu a formação de edema em relação ao grupo controle negativo. Todas as doses de ASAA testadas (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.) inibiram a formação do edema de pata, porém a dose de 100 mg/mL reduziu o edema de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo a partir de 2 h e manteve o efeito por até 48 h (FIGURA 18-A). Pela análise dos resultados obtidos após 4 horas de experimento (FIGURA 18-B), pode-se verificar efeito antiedematogênico de maneira dose dependente, com  $DE_{50}$  de 31,1 mg/kg. Estes resultados fortemente indicam que a fração ASAA apresenta efeito anti-inflamatório, uma vez que o edema é uma das alterações observadas durante o processo de inflamação.

Pelo fato da fração ASAA apresentar efeito anti-inflamatório, as frações obtidas a partir dela por ultrafiltração (ARF50, ARF30 e AEF30) também foram submetidas ao ensaio de edema de pata, a fim de verificar se alguma destas frações apresenta efeito anti-inflamatório superior às demais. As doses testadas foram calculadas a partir da  $DE_{50}$  e do rendimento de cada fração. O resultado deste experimento está mostrado na FIGURA 19, onde é possível verificar que todas as frações reduziram a formação de edema em relação ao grupo controle negativo, sendo que a fração AEF30 apresentou o pior resultado neste teste, tendo em vista que ela foi utilizada em maior dose. Todas as frações testadas apresentam



polissacarídeos semelhantes, mas com diferentes massas molares, sendo que a fração AEF30 possui o menor polímero. Portanto, conclui-se que pequenas alterações estruturais nos polissacarídeos podem influenciar o efeito anti-inflamatório.

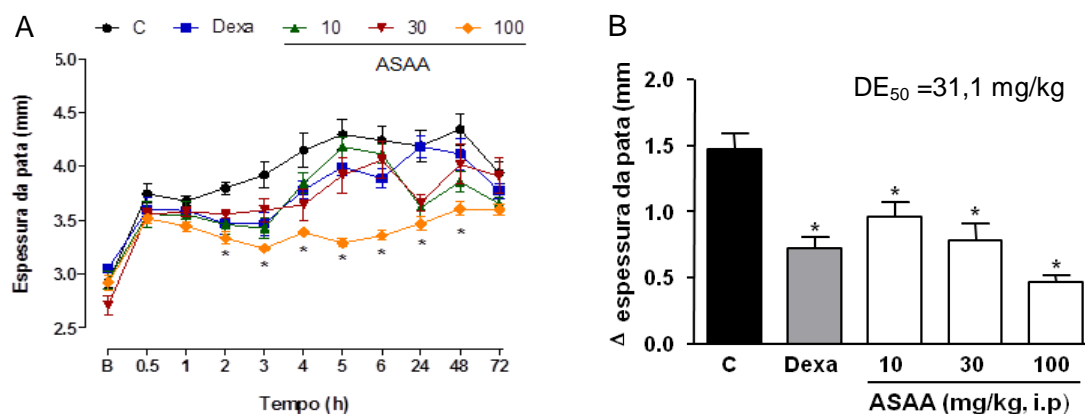


FIGURA 18 – EFEITO DA FRAÇÃO ASAA (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.) NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA. A) EXPERIMENTO MONITORADO POR ATÉ 72 h E B) RESULTADOS OBTIDOS APÓS 4 HORAS.

NOTAS: C: Controle negativo (salina, 0,1 mL/10 g, via i.p.). Dexa (dexametasona, 0,5 mg/kg, via i.p.). Comparação estatística foi realizada por análise de variância (Anova), seguida pelo teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle.

De acordo com Ovodova *et al.* (2009), o efeito anti-inflamatório observado pode ser mediado pela diminuição na produção de interleucina-1 $\beta$  (pró-inflamatória) e aumento de interleucina-10 (anti-inflamatória), bem como pela diminuição da migração de neutrófilos para o local lesionado.

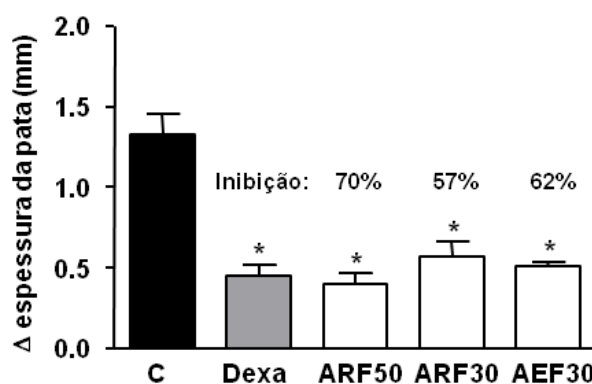


FIGURA 19 – EFEITO DAS FRAÇÕES ARF50 (7,7 mg/kg, i.p.), ARF30 (4,9 mg/kg, i.p.) E AEF30 (18,4 mg/kg, i.p.) NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.

NOTAS: C: Controle negativo (salina, 0,1 mL/10 g, via i.p.). Dexa: dexametasona, 0,5 mg/kg, via i.p.). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (Anova), seguida pelo teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle negativo.

## 5.4 ANÁLISE DOS COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLAR

### 5.4.1 Análise estrutural da fração FSE

#### 5.4.1.1 Análise por ESI-MS em modo *offline*

A fração FSE, que contém os compostos de baixa massa molar que ficaram solúveis após o tratamento do extrato aquoso com etanol (rendimento de 48,3 g), foi submetida a análises por ESI-MS em modo *offline* positivo e negativo (FIGURA 20), com o objetivo de identificar os compostos presentes. ESI-MS em modo positivo foi realizado após adição de lítio nas amostras, verificando-se a presença dos adutos de lítio  $[M+Li]^+$  de  $m/z$  187 (hexose),  $m/z$  349 (dissacarídeo),  $m/z$  361 (ácidos monocateoilquínicos) e  $m/z$  523 (ácidos dicaféoilquínicos). Adutos de potássio  $[M+K]^+$  de  $m/z$  219 (hexose) e  $m/z$  381 (dissacarídeo) também foram observados, pois potássio é um íon comumente encontrado em vegetais. Os principais compostos identificados como íons desprotonados  $[M-H]^-$  na análise de ESI-MS modo *offline* negativo foram o ácido caféico ( $m/z$  179), ácido quínico ( $m/z$  191), ácidos caféoilquínicos ( $m/z$  353 e 391, fragmentos em  $m/z$  191, 176 e 173), quercitina-ramnosídeo ( $m/z$  447, fragmento em  $m/z$  301), quercitina-hexosídeo ( $m/z$  463, fragmento em  $m/z$  301), ácidos dicaféoilquínicos ( $m/z$  515, fragmentos em  $m/z$  353, 191, 176 e 173), cluster de ácido quínico ( $m/z$  383, fragmento em  $m/z$  191), caempferol- ou luteolina-diglicosídeo ( $m/z$  593, fragmento em  $m/z$  285) e rutina ( $m/z$  609, fragmento em  $m/z$  301). As análises *offline* por ESI-MS não foram suficientes para determinar quais isômeros de ácidos clorogênicos estavam presentes na amostra, tendo em vista que quatro isômeros são possíveis para os ácidos monocateoilquínicos (ácido caféico esterificando a hidroxila do ácido quínico na posição 1, 3, 4, ou 5) e seis isômeros são possíveis para os ácidos dicaféoilquínicos (1,3-, 1,4-, 1,5-, 3,4-, 3,5-, ou 4,5-) (LIN *et al.*, 2008), conforme pode ser visualizado na FIGURA 21. Sendo isômeros, estes não podem ser diferenciados apenas pela massa.

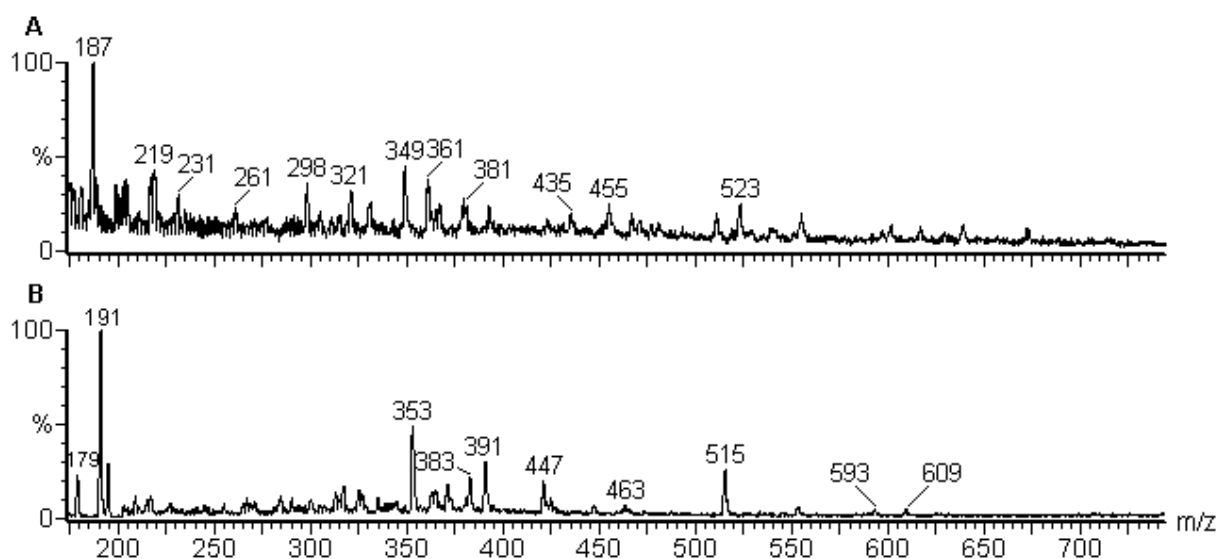


FIGURA 20 – ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO OFFLINE POSITIVO (A) E NEGATIVO (B) DA FRAÇÃO FSE.

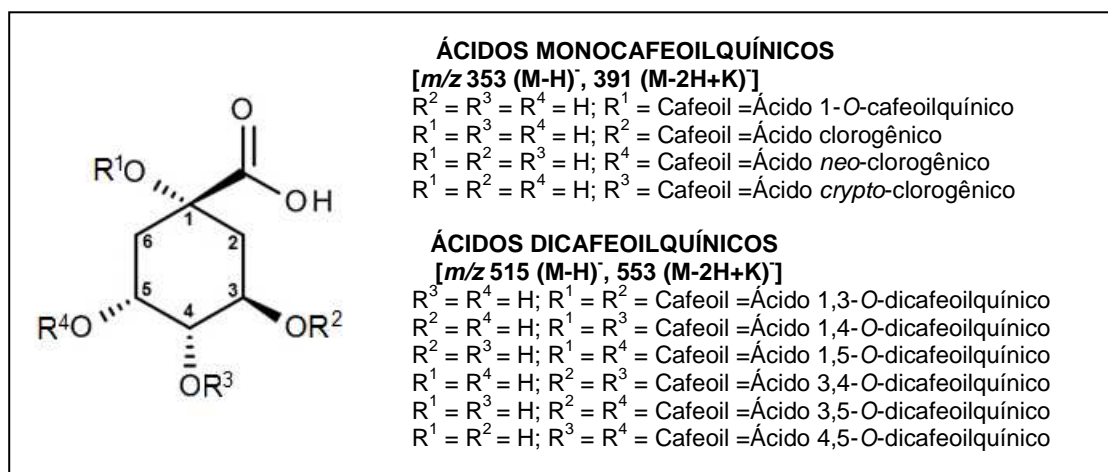


FIGURA 21 – ESTRUTURA DOS ÁCIDOS MONOCAFEILOQUÍNICOS E DICAFEILOQUÍNICOS.

#### 5.4.1.2 Análise por UHPLC-PDA-ESI-MS

A identificação precisa dos compostos de baixa massa molar presentes nas frações foi realizada por UHPLC-PDA-ESI-MS. A caracterização dos compostos por UHPLC-PDA foi realizada pela comparação dos cromatogramas das amostras com padrões de flavonóide (rutina) e de ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ácido caféico e ácido 3-O-cafeoilquínico). A escolha de tais padrões deve-se ao fato destes compostos (com exceção do ácido *p*-cumárico) terem sido observados por ESI-MS

em modo *offline* e também pelo fato de estudos prévios relatarem a presença, nas folhas de *A. lappa*, de flavonóides (rutina, quercitrina, quercetina e luteolina) e de ácidos fenólicos (ácidos caféico, benzoico, *p*-cumárico e clorogênicos - especificamente ácido 3-O-cafeoilquínico e cinarina) (FERRACANE *et al.*, 2009; LOU *et al.*, 2010). Devido ao fato de ácidos clorogênicos terem sido descritos nesta planta, e de que tais compostos são encontrados na forma de isômeros, além dos padrões descritos, uma amostra de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) já caracterizada previamente em nosso laboratório por Dartora *et al.* (2011), também foi utilizada como referência. A erva-mate apresenta uma série de isômeros de ácidos clorogênicos em sua composição, principalmente os ácidos *neo*-clorogênico (5-O-cafeoilquínico), clorogênico (3-O-cafeoilquínico), *crypto*-clorogênico (4-O-cafeoilquínico), 3,4-O-dicafeoilquínico, 3,5-O-dicafeoilquínico e 4,5-O-dicafeoilquínico (DARTORA *et al.*, 2011).

A análise dos compostos de baixa massa molar presentes nas folhas de *A. lappa* foi realizada também por UHPLC-MS. A caracterização dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas obtidos com dados da literatura.

Pela comparação dos cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA da fração FSE (FIGURA 22-A) e da amostra referência de *Ilex paraguariensis* (FIGURA 22-B), pode-se verificar que os picos 2, 4, 5, 10, 12 e 15 da fração FSE apresentaram o mesmo tempo de retenção (*t*<sub>R</sub>) daqueles já previamente identificados na amostra de *Ilex paraguariensis* (DARTORA, 2010). Assim, o pico 2 (*t*<sub>R</sub> 1,30) foi atribuído ao ácido *neo*-clorogênico, pico 4 (*t*<sub>R</sub> 1,97) ao ácido clorogênico, pico 5 (*t*<sub>R</sub> 2,10) ao ácido *crypto*-clorogênico, pico 10 (*t*<sub>R</sub> 4,68) ao ácido 3,4-O-dicafeoilquínico, pico 12 (*t*<sub>R</sub> 4,78) ao ácido 3,5-O-dicafeoilquínico e pico 15 (*t*<sub>R</sub> 5,48) ao ácido 4,5-O-dicafeoilquínico. Além disso, o pico 4 também apresentou mesmo *t*<sub>R</sub> que o padrão de ácido clorogênico (*t*<sub>R</sub> 1,97), confirmando o resultado obtido por comparação com a amostra de *Ilex paraguariensis*. O pico 8 (*t*<sub>R</sub> 4,35) foi atribuído à rutina, por apresentar mesmo *t*<sub>R</sub> que o respectivo padrão. Além disso, com exceção dos picos 8 e 14, todos os picos da fração FSE apresentaram espectro de UV idêntico na faixa de 200-400 nm (FIGURA 22-A), sendo este espectro típico do ácido caféico e de derivados cafeoil (bandas de absorção máxima em ~325 e ~245 nm), confirmando assim que todos estes compostos são derivados cafeoilquínicos. Para a confirmação da caracterização dos picos 2, 4, 5, 8, 10, 12 e 15 e para possível

identificação dos outros picos presentes na fração FSE (picos 1, 3, 6, 7, 9, 11, 13 e 14), a referida fração foi submetida à análise por UHPLC-MS em modo negativo.

Apesar de isômeros apresentarem normalmente perfil de fragmentação semelhantes, Carini *et al.* (1988) descreveram algumas diferenças importantes no perfil de fragmentação induzida por colisão, em modo negativo, de isômeros de ácidos monocateoilquínicos submetidos à análise por LC-MS. Diferenças no padrão de fragmentação também foram descritas por DARTORA *et al.* (2011) durante a análise de ácidos clorogênicos da erva-mate. Na análise da fração FSE por LC-MS, verificou-se fragmentação na fonte com perfil muito semelhante ao descrito anteriormente por CARINI *et al.* (1998) e DARTORA *et al.* (2011), permitindo a precisa identificação de três isômeros monocateoilquínicos presentes.

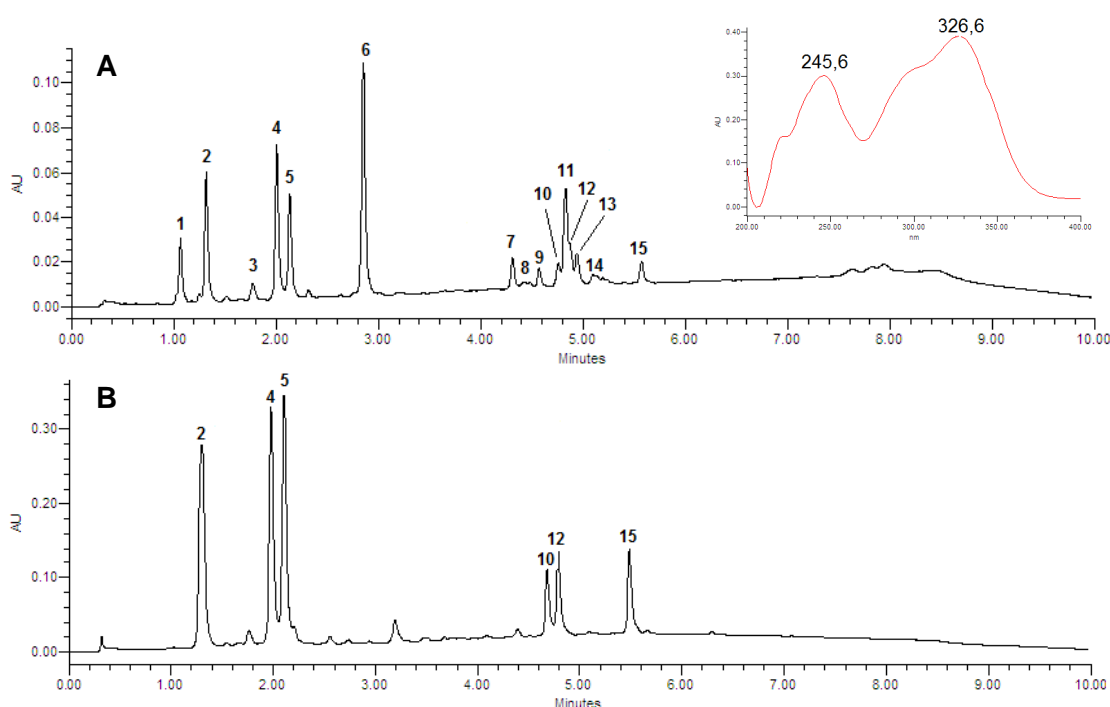


FIGURA 22 – CROMATOGRAMA UHPLC-PDA (325 nm) DA FRAÇÃO FSE COM INSERTO DO ESPECTRO DE UV NA FAIXA DE 200 A 400 nm (A) E CROMATOGRAMA DA AMOSTRA REFERÊNCIA DE *Ilex paraguariensis* (B).

Os principais íons negativos obtidos a partir da série de ácidos monocateoilquínicos (picos 2, 4 e 5) foram  $m/z$  353  $[M-H]^-$  e os íons oriundos de sua fragmentação na fonte:  $m/z$  191 (ácido quínico),  $m/z$  179 (ácido caféico),  $m/z$  173 (ácido quínico desidratado) e  $m/z$  135 (ácido caféico descarboxilado). A FIGURA 23 apresenta um esquema de fragmentação para um ácido monocateoilquínico. Os

isômeros monocafeoilquínicos (FIGURA 24-A, B e C) apresentaram diferentes perfis de fragmentação para o íon  $m/z$  353: o pico 2 (tR 1,30) apresentou os íons  $m/z$  135,  $m/z$  179 e  $m/z$  191, o que é característico de ácido *neo*-clorogênico; o pico 4 (tR 1,98), por apresentar apenas o íon  $m/z$  191, foi caracterizado como ácido clorogênico; e o pico 5 (tR 2,10), cujo principal íon é o  $m/z$  173, que está ausente nos outros isômeros, foi identificado como ácido *crypto*-clorogênico. Estes resultados confirmam a identificação destes compostos realizada por LC-PDA, onde estes isômeros apresentaram os mesmos tR que aqueles da amostra referência de *Ilex paraguariensis*.

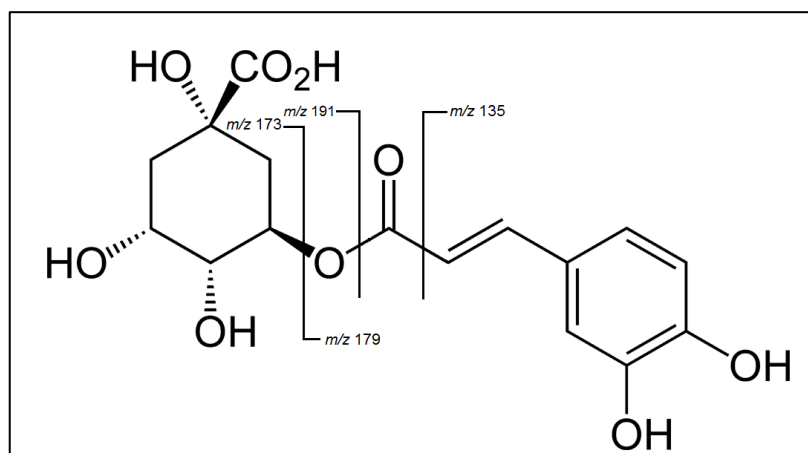


FIGURA 23 – ESQUEMA DE FRAGMENTAÇÃO DE UM ÁCIDO MONOCAFEOLQUÍNICO.

Os picos 10, 12 e 15 apresentaram íons característicos de ácidos dicafeoilquínicos e também originaram fragmentação na fonte, sendo esta também diferente para cada isômero (FIGURA 24-D, E e F). Os principais íons foram os de  $m/z$  515 e os característicos de sua fragmentação na fonte:  $m/z$  353,  $m/z$  191,  $m/z$  179,  $m/z$  173 e  $m/z$  135. O ácido 3,4-O-dicafeoilquínico (pico 10) apresentou principalmente o íon  $m/z$  515, além dos fragmentos de menor intensidade  $m/z$  173 e 179. No espectro do ácido 3,5-O-dicafeoilquínico (pico 12) foi possível observar todos os fragmentos característicos, sendo que o fragmento de maior intensidade foi o  $m/z$  135. Já o ácido 4,5-O-dicafeoilquínico (pico 15) também apresentou todos os íons acima descritos, mas o  $m/z$  135 foi visualizado em intensidade baixa.

Os outros picos presentes na fração FSE (1, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 13 e 14), mas ausentes na amostra de *Ilex paraguariensis*, também foram analisados por UHPLC-

MS. O pico 3 (tR 1,76) apresentou fragmentos compatíveis com ácido monocateoilquínico ( $m/z$  353 e 191). Tendo em vista que quatro isômeros monocateoilquínicos contendo ácido *trans*-caféico são possíveis, e que três deles já foram identificados na amostra, sugere-se que o pico 3, por exclusão, seja referente ao 1-O-cafeoilquínico, ou então, seja referente a um dos raros isômeros de ácido monocateoilquínico contendo ácido *cis*-caféico na estrutura, que embora pouco comuns, podem existir em algumas plantas (LIN *et al.*, 2008).

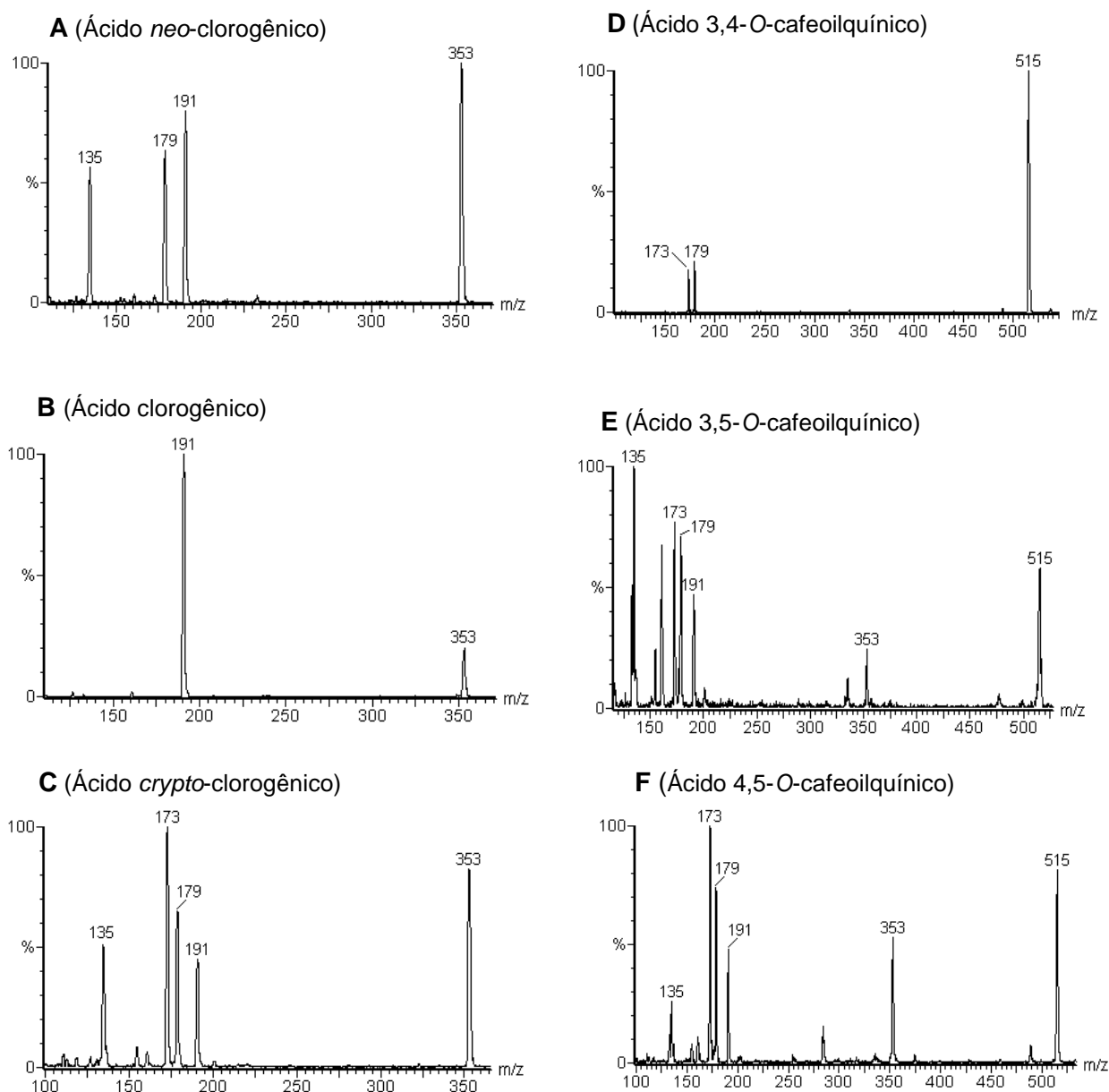


FIGURA 24 – ESPECTROS DE MASSA EM MODO NEGATIVO DO PICO 2 (A), PICO 4 (B), PICO 5 (C), PICO 10 (D), PICO 12 (E) E PICO 15 (F).

Os picos 6 e 10 apresentam perfil de fragmentação característico de ácido dicafeoilquínico ( $m/z$  515,  $m/z$  353  $m/z$  191 e  $m/z$  179). Considerando que seis isômeros são possíveis para ácidos dicafeoilquínicos contendo ácido *trans*-caféico, e que três já foram caracterizados na amostra, apresentam-se apenas três possibilidades: 1,3-, 1,4- ou 1,5-*O*-dicafeoilquínico.

O pico 8 mostrou um íon desprotonado com  $m/z$  609, com fragmentos em  $m/z$  301,  $m/z$  271 e  $m/z$  255, consistente com a estrutura da rutina, confirmando assim a identificação feita anteriormente por UHPLC-PDA. O pico 9 ( $t_R$  4,48) apresentou íon  $m/z$  em 631, com fragmentos em  $m/z$  353,  $m/z$  179 e  $m/z$  191, o que é característico de ácido cafeoilquínico-glicosídeo. E o pico 14 ( $t_R$  5,02) foi atribuído a quercetina-ramnosídeo, por apresentar o íon  $m/z$  447, com fragmentos em  $m/z$  301. A identificação de todos os picos presentes na fração FSE por UHPLC-PDA-MS encontra-se descrita na Tabela 4.



TABELA 4 – UHPLC-PDA-MS EM MODO NEGATIVO DOS COMPONENTES PRESENTES NO SOBRENADANTE ETANÓLICO (FSE) DAS FOLHAS DE *A. lappa*.

Pico	tR (min)	Íon (m/z)	Fragmentos principais	Compostos identificados	Referência
1	1,04	-	-	n.i.	-
2	1,30	353	135, 179, 191	Ácido <i>neo</i> -clorogênico	Amostra <i>Ilex paraguariensis</i> ; Carini <i>et al.</i> (1998); Dartora (2010)
3	1,76	353	191	Ácido monocateoilquínico	Lin <i>et al.</i> (2008)
4	1,97	353	191	Ácido clorogênico	Amostra <i>Ilex paraguariensis</i> ; Carini <i>et al.</i> (1998); Dartora (2010)
5	2,10	353	135, 173, 179, 191	Ácido <i>crypto</i> -clorogênico	Amostra <i>Ilex paraguariensis</i> ; Carini <i>et al.</i> (1998); Dartora (2010)
6	2,79	515	179, 191, 353	Ácido dicafeoilquínico	Lin <i>et al.</i> (2008)
7	4,23	-	-	n.i.	-
8	4,35	609	255, 271, 301	Rutina	Padrão
9	4,48	631	179, 191, 353	Ácido cafeoilquínico-glicosídeo	Lin <i>et al.</i> (2008)
10	4,68	515	135, 179, 191, 353	Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico,	Amostra <i>Ilex paraguariensis</i> ; Carini <i>et al.</i> (1998); Dartora (2010)
11	4,74	515	179, 191, 353	Ácido dicafeoilquínico	Lin <i>et al.</i> (2008)
12	4,78	515	135, 173, 179, 191, 353	Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico	Amostra <i>Ilex paraguariensis</i> ; Carini <i>et al.</i> (1998); Dartora (2010)
13	4,84	-	-	n.i.	-
14	5,02	447	301	Quercetina-ramnosídeo	Souza <i>et al.</i> (2008, 2009)
15	5,48	515	135, 173, 179, 191, 353	Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico	Amostra <i>Ilex paraguariensis</i> ; Carini <i>et al.</i> (1998); Dartora (2010)

NOTA: n.i.: não identificado.

#### 5.4.2 Atividade antiúlcera da fração FSE

A fração FSE foi submetida a teste biológico para avaliação de atividade gastroprotetora. A avaliação desta atividade biológica deve-se ao fato da planta ser utilizada na medicina popular no tratamento da úlcera gástrica, bem como pelo fato

de um estudo anterior (CALIXTO, 2003) relatar este efeito para as folhas da planta, sem, no entanto, caracterizar os compostos responsáveis pelo efeito observado.

O ensaio de atividade antiúlcera gástrica induzida por etanol (FIGURA 25) promoveu a formação de severas lesões gástricas no grupo controle. O tratamento oral dos animais com FSE (1, 10 e 100 mg/kg) reduziu as lesões gástricas induzidas por etanol de uma maneira dose dependente, com  $DE_{50}$  de 3,8 mg/kg. O controle positivo, omeprazol (40 mg/kg), promoveu 93,7 % de gastroproteção.

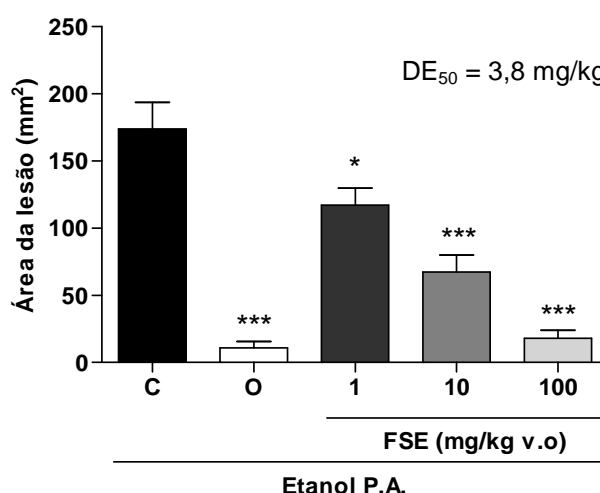


FIGURA 25 – EFEITO DA FRAÇÃO FSE (1, 10 e 100 mg/kg, v.o.) NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.

NOTAS: C: controle negativo (água, v.o.). O: omeprazol (40 mg/kg, v.o.). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (Anova), seguida pelo teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação ao grupo controle negativo.

#### 5.4.3 Fracionamento bioguiado para identificação de compostos com atividade antiúlcera gástrica

O fracionamento da fração FSE foi realizado por partição líquido/líquido, a fim de que os compostos possivelmente relacionados ao efeito antiúlcera gástrica fossem identificados. A partição líquido:líquido foi realizada com solventes em grau crescente de polaridade, originando as frações clorofórmica (FSE-C), acetato de etila (FSE-AE), butanólica (FSE-B) e aquosa (FSE-AQ). Este tipo de fracionamento possibilita a retenção de diferentes classes de compostos em cada fração e, pela análise da fração que apresentar o melhor resultado no ensaio de atividade gastroprotetora, é possível inferir a identidade dos compostos possivelmente

relacionados ao efeito. A FIGURA 26 mostra resumidamente o processo de extração e fracionamento dos metabólitos secundários e a Tabela 5 apresenta o rendimento de todas as frações obtidas neste processo.

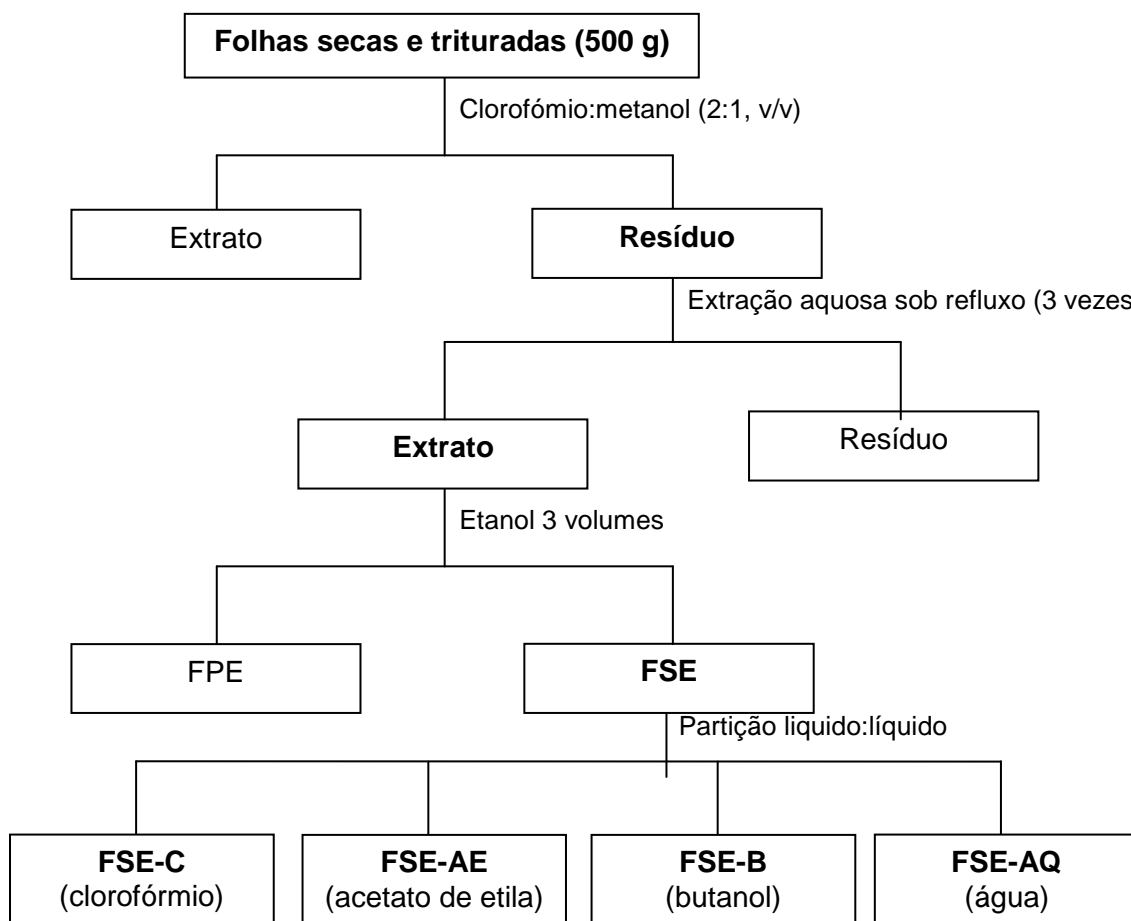


FIGURA 26 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLAR OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE *A. lappa*.

TABELA 5 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DERIVADAS DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO DOS COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLAR OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE *A. lappa*.

Frações	Rendimento <sup>(1)</sup> (%)
FSE-C	0,34
FSE-AE	4,00
FSE-B	8,00
FSE-AQ <sup>(2)</sup>	51,9

NOTAS: <sup>(1)</sup> Rendimento baseado em 30 g de fração FSE. <sup>(2)</sup> Parte do material foi perdida durante o procedimento de fracionamento.

As frações obtidas pela partição líquido:líquido foram submetidas a ensaio para avaliação de atividade gastroprotetora (FIGURA 27), utilizando-se como controle positivo omeprazol (40 mg/mL), que promoveu inibição significativa da lesão gástrica (96,9%). A administração oral da fração FSE-AE (0,15 mg/kg, v.o.) exibiu significativa atividade antiúlcera, uma vez que reduziu a lesão gástrica induzida por etanol em 63,54%. Em contraste, as frações FSE-C, FSE-B e FSE-AQ não mostraram efeito. Estes resultados indicam que a fração FSE-AE apresenta os compostos responsáveis pela gastroproteção. As doses das diferentes frações (FSE-C, FSE-AE, FSE-B e FSE-AQ) utilizadas no experimento de atividade antiúlcera da FIGURA 27 foram calculadas de acordo com a contribuição de cada fração para a  $DE_{50}$  da fração FSE (3,8 mg/kg), considerando o rendimento de cada uma das frações.

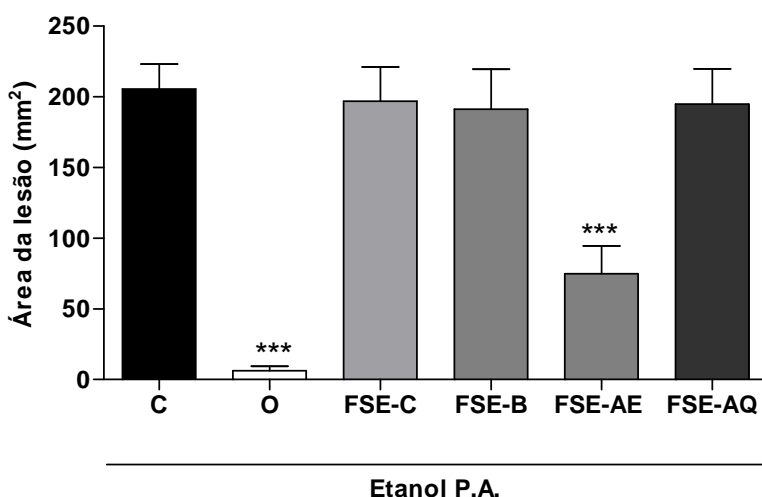


FIGURA 27 – EFEITO DAS FRAÇÕES FSE-C (0,01 mg/kg, v.o.), FSE-AE (0,15 mg/kg, V.O.), FSE-B (0,30 mg/kg, v.o.) E FSE-AQ (1,99 mg/kg, v.o.) NA ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL. NOTAS: C: controle negativo (água, v.o.). O: omeprazol (40 mg/kg,v.o.). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (Anova), seguida pelo teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

#### 5.4.4 Análise das frações obtidas por partição líquido/líquido

As únicas frações obtidas por partição líquido/líquido que apresentaram os compostos detectados nas análises de UHPLC-PDA-MS da fração FSE foram as frações FSE-AE e FSE-B, portanto apenas estas frações serão analisadas quanto à sua composição. A análise comparativa destas duas frações é essencial para

determinação dos compostos responsáveis pelo efeito antiúlcera gástrica, considerando que diferenças na composição destas duas frações refletiram diretamente no efeito biológico apresentado, uma vez que somente a fração FSE-AE apresentou atividade (FIGURA 27). Já a fração FSE-AQ, por ter sido obtida a partir do solvente com maior polaridade na partição líquido:líquido (água), é a fração que concentra compostos polares, como os açúcares, visualizados na fração FSE por ESI-MS em modo *offline*, bem como os sais inorgânicos geralmente associados aos vegetais.

Observa-se que o cromatograma obtido por UHPLC-PDA da fração FSE-AE (FIGURA 28-B) é qualitativamente similar àquele da fração FSE (FIGURA 28-A), mas com diferença significativa na proporção entre ácidos monocateoilquínicos e dicaféoilquínicos. Pela análise do cromatograma, é possível verificar que ocorreu diminuição na abundância de todos os ácidos monocateoilquínicos, exceto do ácido monocateoilquínico em tR 1,76 (pico 3), sendo possível observar diminuição na intensidade dos picos referentes aos ácidos *neo*-clorogênico (pico 2), clorogênico (pico 4) e *crypto*-clorogênico (pico 5). Por outro lado, observou-se aumento significativo na concentração dos ácidos 3,4-O-dicaféoilquínico (pico 10), 3,5-O-dicaféoilquínico (pico 12), 4,5-O-dicaféoilquínico (pico 15), sendo notável o aumento na intensidade do ácido dicaféoilquínico em tR 4,74 (pico 11). O único ácido dicaféoilquínico que apresentou diminuição em sua proporção na fração FSE-EA foi o isômero com tR em 2,79 (pico 6). Observou-se também aumento dos flavonóides rutina (pico 8) e quercetina-ramnosídeo (pico 14) nesta fração.

A fração FSE-B (FIGURA 28-C), de forma oposta ao visualizado na fração FSE-AE, apresentou uma proporção de ácidos monocateoilquínicos muito superior à de ácidos dicaféoilquínicos. Este fato pode ser observado pelo aumento nas intensidades dos ácidos *neo*-clorogênico (pico 2), clorogênico (pico 4) e *crypto*-clorogênico (pico 5). Já o ácido monocateoilquínico em tR 1,76 (pico 3), apresentou-se diminuído na fração FSE-B, uma vez que foi concentrado na fração FSE-AE. Uma drástica redução nos ácidos dicaféoilquínicos pôde ser visualizada nesta fração, exceto do isômero em tR 2,79 (pico 6), o qual se manteve quase que integralmente na fração FSE-B.

Portanto, diferenças significativas na proporção dos compostos químicos existentes nas frações FSE-AE e FSE-B podem ser observadas, o que é coerente com o tipo de fracionamento realizado, tendo em vista que o solvente acetato de

etila, por apresentar polaridade menor que o butanol, apresenta afinidade pelos ácidos clorogênicos menos polares, ou seja, os ácidos dicafeoilquínicos. E considerando que a fração FSE-AE foi a única a apresentar efeito antiúlcera gástrica, pode-se inferir que os ácidos dicafeoilquínicos presentes nesta fração, principalmente o isômero em tR 4,74 (pico 11), por ser o mais abundante, podem estar relacionados ao efeito gastroprotetor observado. Este fato está de acordo com estudo realizado por Silva *et al.* (2013), que demonstrou que o extrato etanólico bruto das raízes da planta *A. lappa* apresentou atividade antiúlcera gástrica, sendo que os principais constituintes deste extrato são uma série de ácidos hidroxicinamoilquínicos, principalmente ácidos dicafeoilquínicos. No referido trabalho, o efeito gastroprotetor foi mediado pela diminuição do volume e acidez total da secreção gástrica, redução do processo inflamatório e por mecanismos antioxidantes.

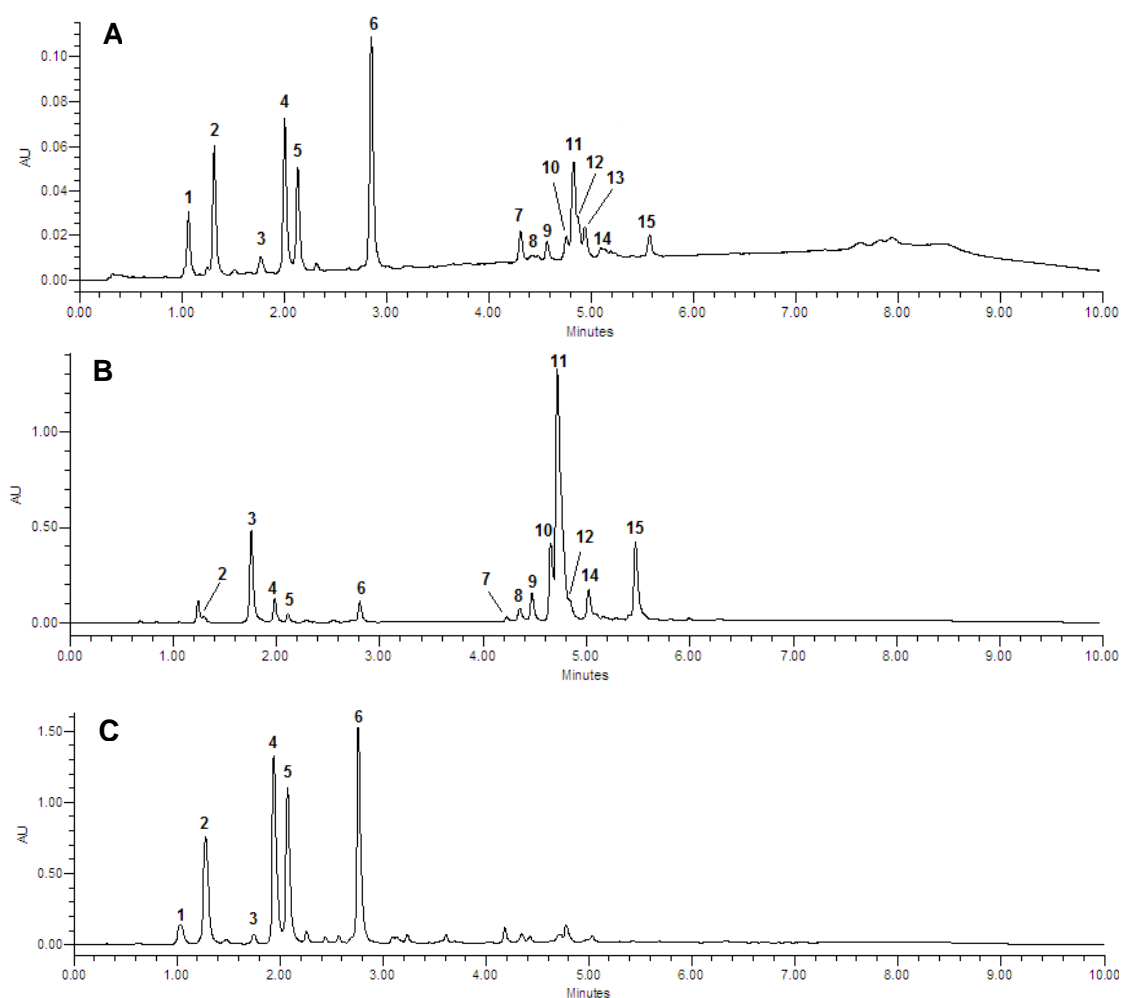


FIGURA 28 – COMPARAÇÃO POR UHPLC-PDA (325 nm) ENTRE AS FRAÇÕES FSE (A), FSE-AE (B) E FSE-B (C).

Com o intuito de caracterizar o ácido monocateoilquínico referente ao pico 3, realizou-se análise comparativa por GC-MS dos derivados obtidos por metanólise e acetilação das amostras FSE-AE e FSE-B e dos padrões de ácido clorogênico (ácido 3-O-cafeoilquínico) e ácido *trans*-caféico. Desta maneira, é possível verificar se o referido pico corresponde ao isômero contendo ácido *trans*-caféico (ácido 1-O-cafeoilquínico) ou a um dos raros isômeros monocateoilquínicos contendo ácido *cis*-caféico na estrutura. Os cromatogramas obtidos por GC-MS das amostras estão descritos na FIGURA 29 A-B, onde pode-se visualizar a existência de dois picos (1 e 2) que, por comparação ao tR dos padrões, correspondem ao ácido *trans*-caféico e ácido quínico, respectivamente. Os perfis de fragmentação obtidos dos compostos referentes aos picos 1 (FIGURA 29-C) e 2 (FIGURA 29-D) também são característicos de ácido quínico e *trans*-caféico, respectivamente. Isso indica que todos os ácidos clorogênicos das frações analisadas apresentam somente o ácido *trans*-caféico em suas estruturas, sendo possível inferir que o pico 3 trata-se do ácido 1-O-cafeoilquínico.

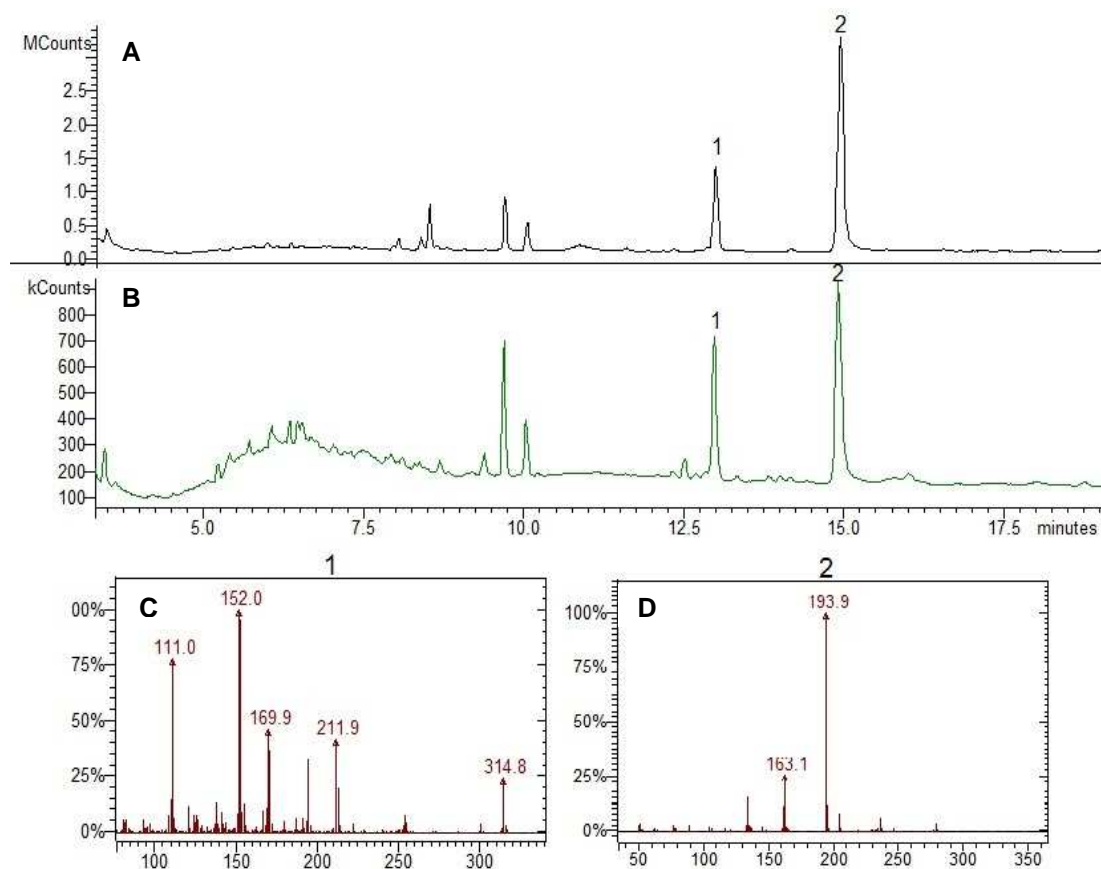


FIGURA 29 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR GC-MS DAS FRAÇÕES FSE-AE (A) E FSE-B (B) APÓS METANÓLISE E ACETILAÇÃO. FRAGMENTAÇÃO POR IONIZAÇÃO POR ELÉTRONS (70 eV) DO PICO 1 (ÁCIDO QUÍNICO) (C) E DO PICO 2 (ÁCIDO CAFÉICO) (D) DERIVATIZADOS.

### 5.4.5 Acetalação

A elucidação estrutural dos isômeros referentes aos picos 6 e 11, presentes em maior intensidade nas frações FSE-B e FSE-AE, respectivamente, é de extrema importância, principalmente pelo fato de que somente um deles (pico 11) está associado ao efeito gastroprotetor. Devido ao fato de existirem apenas 3 possibilidades estruturais (1,3-, 1,4- ou 1,5-O-dicafeoilquínico) para os referidos picos, sendo que em todas elas a hidroxila 1 encontra-se esterificada por resíduo de ácido caféico, a dúvida consiste apenas na posição da substituição pelo segundo resíduo de ácido caféico (hidroxila 3, 4 ou 5).

Sabendo-se que o ácido quínico apresenta a hidroxila 3 em configuração *trans* e as hidroxilas 4 e 5 em configuração *cis* (FIGURA 30), é possível promover uma reação de acetalação seletiva a fim de identificarmos a posição de esterificação pelo ácido caféico. A reação de acetalação utilizando acetona em meio ácido leva à formação de derivado O-isopropilideno quando existem condições de estereoquímica específica em moléculas contendo grupos hidroxila, entre as quais a existência de duas hidroxilas vicinais livres em configuração *cis* (SOUZA *et al.*, 2011). Esta condição de estereoquímica é observada no ácido 1,3-O-dicafeoilquínico, tornando possível a identificação deste isômero pela formação de derivado 4,5-O-isopropilideno (FIGURA 31).

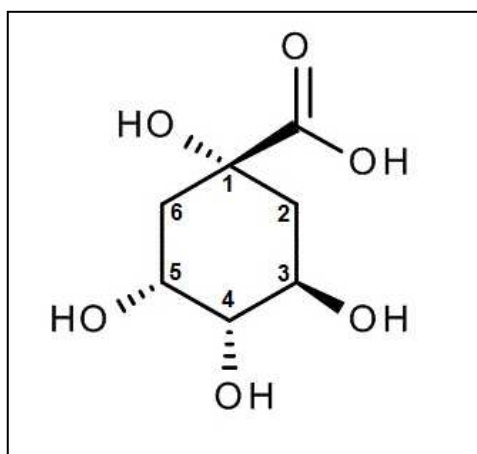


FIGURA 30 – ETRUTURA DO ÁCIDO QUÍNICO.



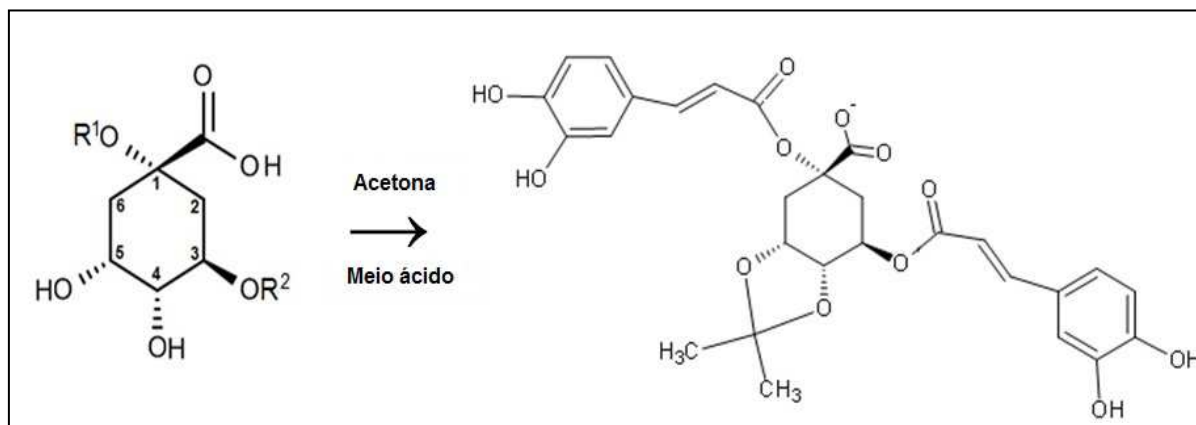


FIGURA 31 – REAÇÃO DE ACETALAÇÃO COM FORMAÇÃO DE DERIVADO 4,5-O-ISOPROPILIDENO.

NOTA:  $R^1 = R^2 = \text{Cafeoil} = \text{Ácido 1,3-O-dicafeoilquínico}$ .

Antes da realização da reação de acetalação com as amostras FSE-AE e FSE-B, avaliou-se a metodologia com padrão de ácido clorogênico, que também apresenta as hidroxilas 4 e 5 livres e em configuração *cis*. O resultado pode ser visualizado na FIGURA 32-A, onde é possível verificar o deslocamento de parte do pico referente ao ácido clorogênico ( $t_R$  1,97) para uma posição com  $t_R$  maior (5,43). O surgimento deste novo pico é sugestivo do produto da reação de acetalação, ou seja, o derivado ácido 4,5-O-isopropilideno-3-O-cafeoilquínico, que pelo aumento do caráter hidrofóbico fornecido pelo cetal à molécula, apresenta  $t_R$  maior. A presença deste derivado foi confirmada por LC-MS (FIGURA 32-B), onde a presença do grupo cetal promoveu um aumento de 40 unidades de massa (m.u. – *mass units*) à molécula, gerando íon em  $m/z$  393, com fragmento de  $m/z$  231, que confirma que o isopropilideno foi formado apenas no ácido quínico ( $m/z$  191 + 40 m.u. =  $m/z$  231).

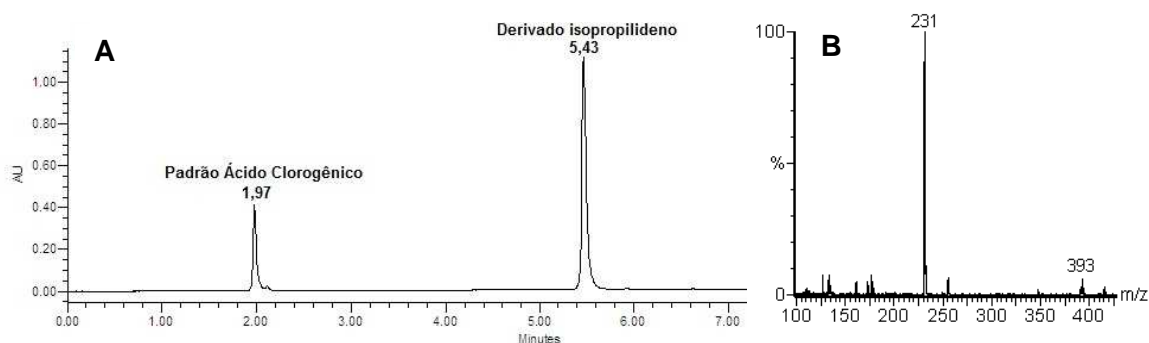


FIGURA 32 – CROMATOGRAMA UHPLC-PDA (325 nm) DO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO APÓS REAÇÃO DE ACETALAÇÃO (A) E ESPECTRO DE MASSAS DO DERIVADO 4,5-O-ISOPROPILIDENO (B).

O resultado da reação de acetalação com a fração FSE-AE foi verificado por LC-PDA-MS (FIGURA 33-B). Pela análise do cromatograma é possível visualizar o desaparecimento do pico 11 em tR 4,74 e seu surgimento em tR 7,51, que é provavelmente referente ao derivado isopropilideno. Por meio da análise de LC-MS do pico em tR 7,51 (FIGURA 34), confirmou-se o aumento de 40 m.u. à molécula de ácido dicafeoilquínico, que passou a apresentar o íon de  $m/z$  555 e fragmentos de  $m/z$  393 e 231, sendo que este último fragmento é indicativo de acetalação no ácido quínico. Isso indica que o pico 11 pode ser caracterizado como ácido 1,3-O-dicafeoilquínico. O produto de acetalação do ácido 1-O-cafeoilquínico, que também apresenta estereoquímica favorável para ocorrência de reação, pode ser visualizado em tR 7,90 (pico 3).

Já a fração FSE-B apresentou resultado negativo na reação de acetalação com o ácido dicafeoilquínico em tR 2,79, pois não foi verificado deslocamento do pico 6. Desta forma, este pico apresenta duas possibilidades estruturais: 1,4- ou 1,5-O-dicafeoilquínico.

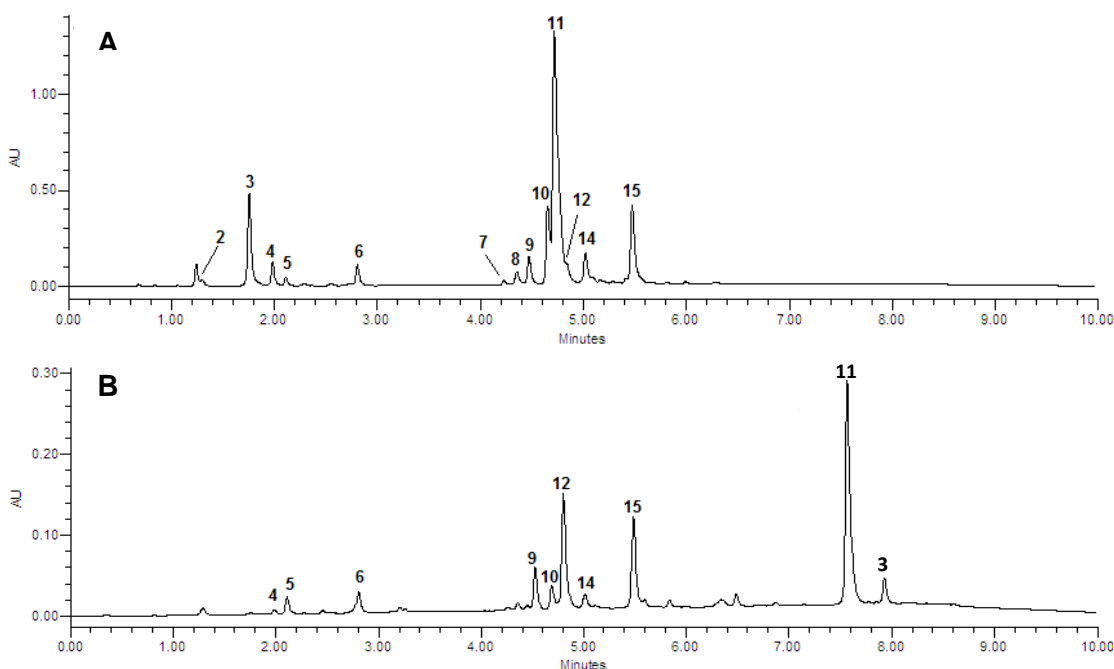


FIGURA 33 – CROMATOGRAMAS UHPLC-PDA (325 nm) DAS FRAÇÕES FSE-AE NATIVA (A) E FSE-AE APÓS REAÇÃO DE ACETALAÇÃO (B).

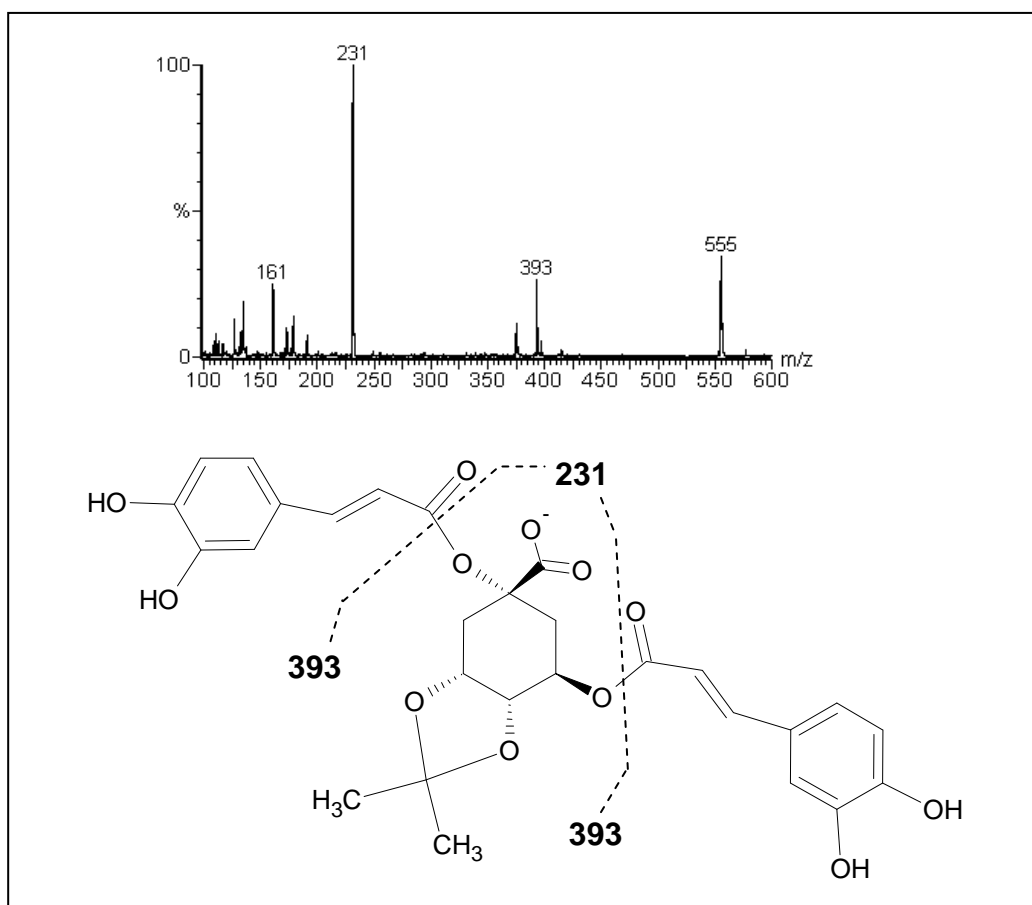


FIGURA 34 – ESPECTRO DE MASSAS DO DERIVADO 4,5-O-ISOPROPILIDENO-3-O-CAFEOILQUÍNICO E SEU RESPECTIVO ESQUEMA DE FRAGMENTAÇÃO.

#### 5.4.5 Purificação e análise do ácido 1,3-O-dicafeoilquínico

Para a caracterização total do composto pico 11 (ácido 1,3-O-dicafeoilquínico), a fração FSE-AE foi submetida à cromatografia preparativa para purificação do referido composto, que foi posteriormente submetido às análises de 2D-RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC-DEPT) e de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY), a fim de caracterizar a estrutura química através de seus característicos deslocamentos químicos.

Com o objetivo de obter uma referência para a caracterização da amostra purificada (AE-DCQ), realizou-se inicialmente a análise por RMN do padrão de ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico), cuja única diferença estrutural em relação ao ácido 1,3-O-dicafeoilquínico é a ausência do resíduo cafeoil esterificado à hidroxila do C-1 do ácido quínico. Pela análise do referido padrão por HSQC-DEPT (FIGURA 35-A), é possível verificar a presença dos sinais referentes aos carbonos

hidroxilados da molécula de ácido quínico em  $\delta$  73,3/3,73, 71,2/4,18 e 71,8/5,35 (TOLONEN *et al.*, 2002). É possível observar que o sinal do hidrogênio em  $\delta$  5,35 apresenta-se deslocado para esquerda em relação aos demais, fato este que pode ser justificado porque em ácidos cafeoilquínicos o grupo cafeoil forma uma ligação éster com um dos grupos hidroxila do ácido quínico, o que faz com que o sinal do hidrogênio ligado a este carbono esterificado apresente deslocamento de sinal (TOLONEN *et al.*, 2002). Considerando que o ácido clorogênico apresenta esterificação por resíduo de ácido caféico na posição 3, conclui-se que o sinal em  $\delta$  71,8/5,35 é relativo ao C-3/H-3 da molécula. Em relação aos outros sinais, não é possível afirmar se pertencem ao C-4/H-4 ou C-5/H-5.

Os sinais que apresentaram inversão no HSQC-DEPT podem ser visualizados em  $\delta$  38,0/2,17 e 38,0/2,08, bem como em  $\delta$  38,6/2,23 e 38,6/2,09, verificando-se em ambos os casos dois sinais distintos de hidrogênios com acoplamento a um único carbono, o que é coerente com a presença de CH<sub>2</sub> nas posições 2 e 6 do anel de ácido quínico, mas não é possível estabelecer a correlação específica de cada sinal.

Na análise de COSY (FIGURA 35-B), pode-se verificar o acoplamento do sinal em  $\delta$  5,35, relativo ao H-3 do ácido quínico, com os sinais de seus respectivos hidrogênios vizinhos, que possuem deslocamentos químicos em 3,73, 2,09 e 2,23 ppm. Considerando que o H-3 apresenta como vizinhos um hidrogênio ligado no C-4 e dois hidrogênios ligados no C-2, pode-se inferir que os sinais em  $\delta$  2,09 e 2,23 são relativos aos hidrogênios do C-2 e o sinal em 3,73 é relativo ao hidrogênio do C-4. E pela análise dos acoplamentos destes hidrogênios no mapa de correlação direta <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY), é possível definir os sinais referentes aos outros hidrogênios do anel de ácido quínico, sendo que o sinal em  $\delta$  4,18 pode ser atribuído ao H-5 e os sinais em  $\delta$  2,17 e 2,08 aos dois hidrogênios ligados ao C-6. E, sabendo-se os sinais de hidrogênio, pode-se estabelecer a identificação de todos os sinais referentes aos carbonos anteriormente visualizados no HSQC, sendo que o sinal em  $\delta$  38,6 pode ser atribuído ao C-2, em  $\delta$  73,3 ao C-4, em  $\delta$  71,2 ao C-5 e o sinal em  $\delta$  38,0 ao C-6.

O composto purificado (AE-DCQ), quando submetido ao HSQC-DEPT (FIGURA 36-A), apresentou sinais em  $\delta$  71,6/5,41, 74,0/3,79 e 70,7/4,26. Por comparação ao padrão de ácido clorogênico e sabendo-se, pela reação de acetalação, que a hidroxila 3 encontra-se esterificada, é possível concluir que os

sinais acima descritos correspondem, respectivamente, ao C-3/-H3, C-4/H-4 e C-5/H-5 da molécula de ácido quínico, observando-se que o sinal do hidrogênio ligado ao C-3 esterificado ao resíduo de ácido caféico ( $\delta$  5,41) apresenta sinal deslocado para esquerda em relação aos demais. E ainda, que os sinais em  $\delta$  37,9/2,67 e 37,9/2,00 podem ser atribuídos ao C-2/H-2<sup>a</sup> e C-2-H-2<sup>b</sup>, e os sinais em  $\delta$  36,5/2,70 e 36,5/2,24 ao C-6/H6<sup>a</sup> e C-6/H-6<sup>b</sup>, sendo as designações “a” e “b” referentes aos dois hidrogênios ligados aos respectivos carbonos. A confirmação da identificação destes sinais pode ser realizada com o auxílio do COSY (FIGURA 36-B), onde pode-se verificar o acoplamento do sinal do H-3 ( $\delta$  5,41) com os sinais de seus respectivos vizinhos em  $\delta$  3,79, 2,67 e 2,00, sendo o primeiro sinal relativo ao H-4 e os outros relativos aos H-2<sup>a/b</sup>. A partir da identificação precisa dos sinais de H-2, H-3 e H-4, é possível caracterizar todos os outros sinais do anel de ácido quínico, confirmando assim a caracterização realizada por comparação ao padrão de ácido clorogênico. A constante de acoplamento obtida para os sinais de ácido caféico  $J_{H/H}$  7,59 e 6,32 foi de 15.9 Hz, característico de configuração *trans*, confirmando a identificação de ácido *trans*-caféico, já obtida previamente pela análise de GC-MS.

Estas análises de RMN, em conjunto com o resultado obtido pela reação de acetalação, confirmam a caracterização do isômero referente ao pico 11 como ácido 1,3-O-dicafeoilquínico.

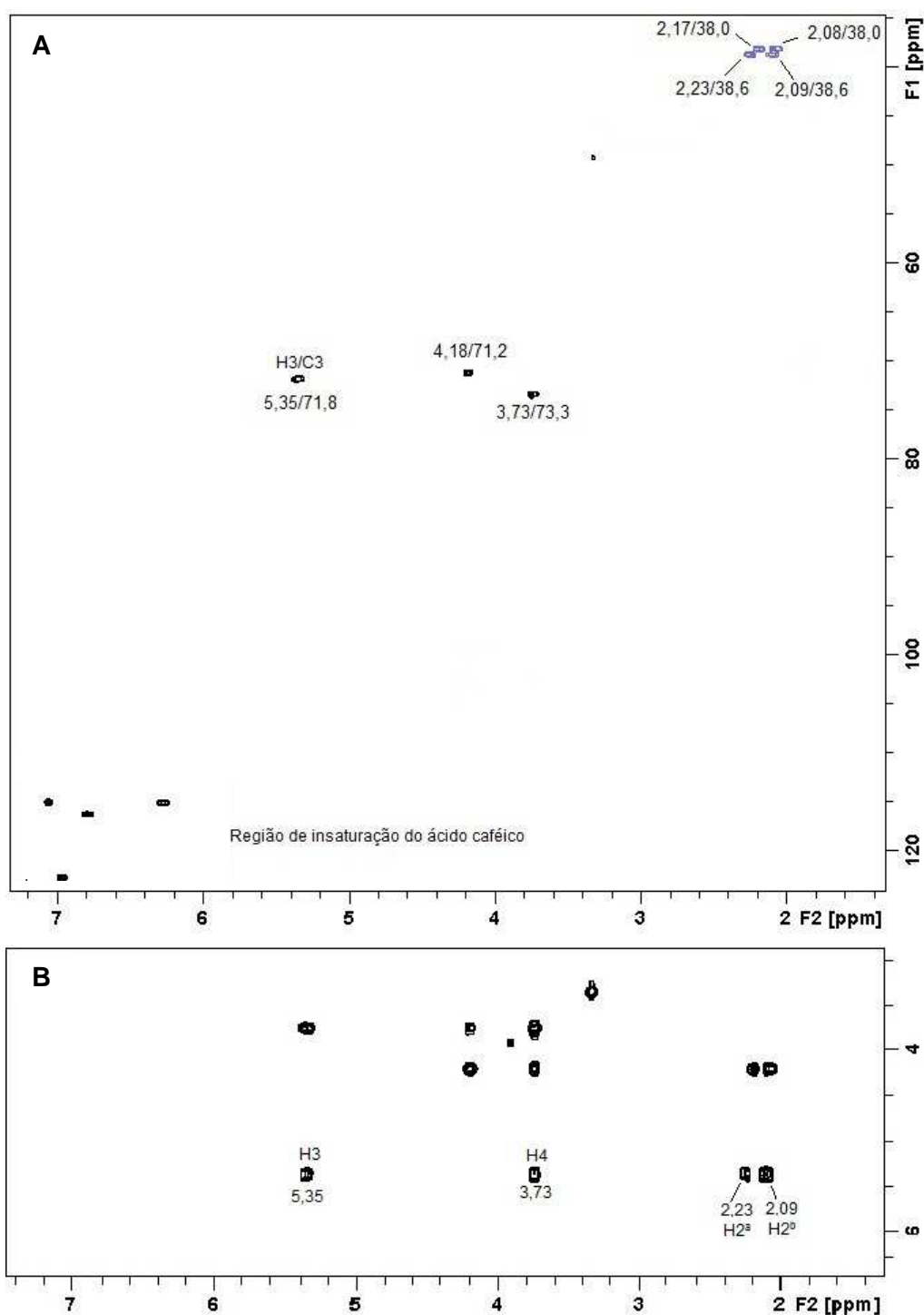


FIGURA 35 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  (HSQC) (A) E INSERTO COM FRAGMENTO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) (B) DO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO.

NOTAS: Experimentos realizados em metanol- $\text{D}_4$  com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm. Sinais em azul representam  $-\text{CH}_2-$  no HSQC-DEPT.

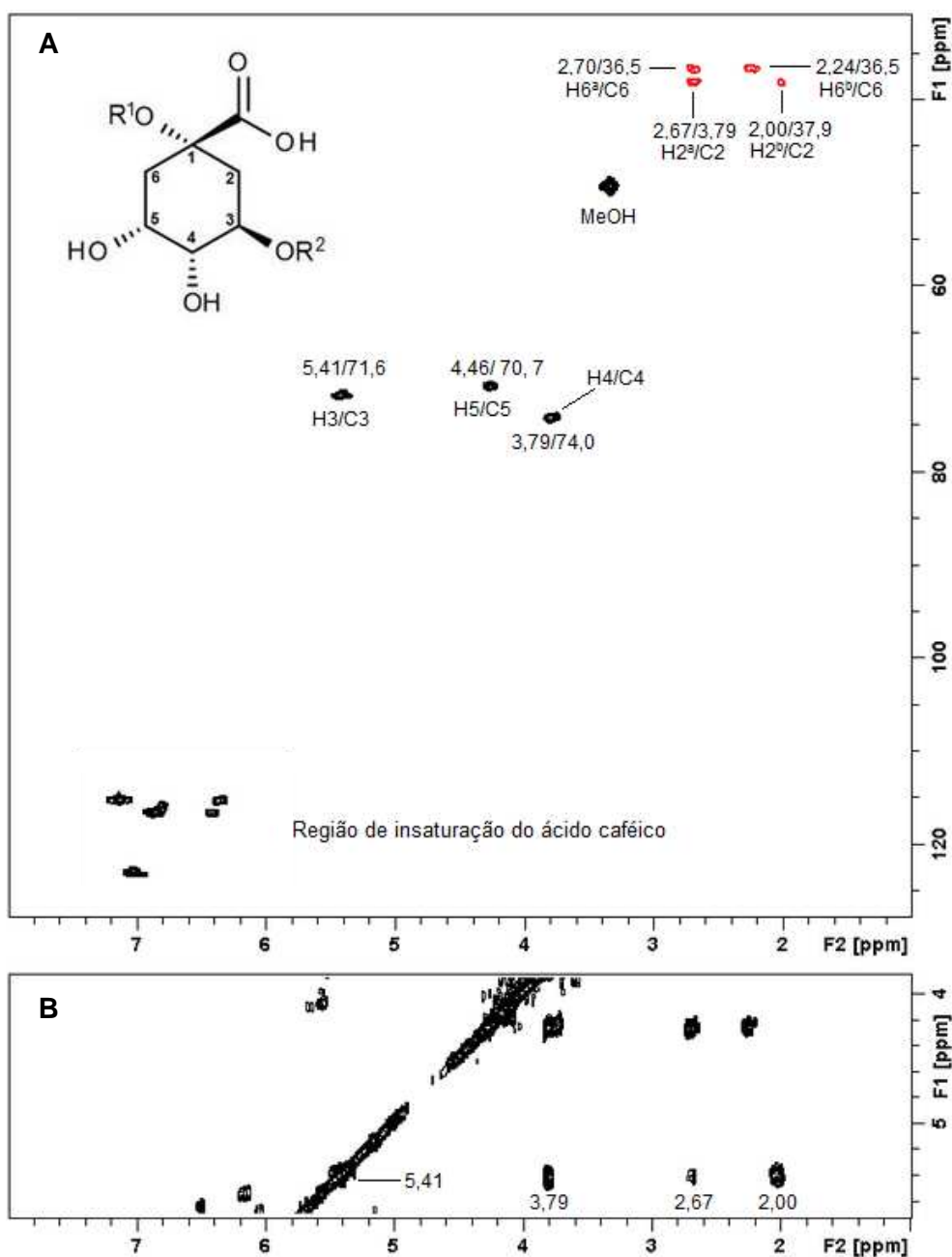


FIGURA 36 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^{13}C$ - $^1H$  (HSQC) E INSERTO COM FRAGMENTO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA  $^1H$ - $^1H$  (COSY) (B) DA FRAÇÃO AE-DCQ.

NOTAS: Experimentos realizados em Metanol-D4 com os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm. Sinais em vermelho representam -CH2- no HSQC-DEPT.

## 6 CONCLUSÃO

- A partir do extrato aquoso das folhas de *A. lappa* foram obtidas as frações ARF50, ARF30 e AEF30 após todas as etapas de fracionamento, e a partir do extrato alcalino foram obtidas as frações BRF30 e BEF30. Análises de RMN e metilação mostraram que todas as frações são constituídas por ramnogalacturonana do tipo I e arabinogalactana tipo II.

- A fração polissacarídica ASAA, obtida a partir da extração aquosa, não apresentou atividade gastroprotetora. Entretanto, esta fração mostrou efeito antiedematogênico, indicando uma provável ação anti-inflamatória. As frações ARF50, ARF30 e AEF30, derivadas de ASAA, também mostraram atividade antiedematogênica, mas com diferentes potências, indicando que diferenças na massa molar ou pequenas diferenças estruturais podem influenciar a atividade destes polissacarídeos.

- O sobrenadante etanólico da extração aquosa das folhas de *A. lappa* (FSE) mostrou-se constituído principalmente por ácidos monocateoilquínicos (ácidos 1-O-cateoilquínico, *neo*-clorogênico, clorogênico e *crypto*-clorogênico) e diccateoilquínicos (ácidos 1,3-O-diccateoilquínico, 3,4-O-diccateoilquínico, 3,5-O-diccateoilquínico, 4,5-O-diccateoilquínico e um isômero com duas possibilidades estruturais - 1,4-O-diccateoilquínico ou 1,5-O-diccateoilquínico), além do ácido cateoilquínico-glicosídeo e dos flavonóies rutina e quercetina-ramnosídeo. O teste para avaliação da atividade antiúlcera desta fração, em ratos, demonstrou que ela é capaz de reduzir a lesão gástrica induzida por etanol de maneira dose dependente.

- O processo de fracionamento bioguiado da fração FSE gerou uma única fração com atividade antiúlcera gástrica, a fração acetato de etila (FSE-AE). A fração FSE-AE apresentou-se qualitativamente semelhante à fração FSE, mas com diferença significativa na proporção dos ácidos fenólicos. Ela apresentou diminuição na abundância dos ácidos monocateoilquínicos e aumento significativo na dos ácidos diccateoilquínicos, principalmente do ácido 1,3-O-diccateoilquínico, indicando que o efeito gastroprotetor observado provavelmente está relacionado aos ácidos diccateoilquínicos presentes na fração FSE.



## 7 REFERÊNCIAS

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; O'NEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. **Progress in biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v. 14, p. 47-55, 1996.

AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 239-244, 2011.

ANANTHI, S.; RAGHAVENDRAN, H. R. B. R.; SUNIL, A. G. GAYATHRI, G. R.; VASANTHI, H. R. *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (marine brown alga). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 187-192, 2010.

ASPINAL, G. O. In: **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, p. 95-115, 1973.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p.143, 1997.

AWALE, S.; LU, J.; KALAUNI, S. K.; KURASHIMA, Y.; TESUKA, Y.; KADOTA, S.; ESUMI, H. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. **Cancer Research**, v. 66, p. 1751-1757, 2006.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v.12, p. 423-432, 2007.

BARROS, M. P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P.B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 372-377, 2008.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011.

BURLANDO, B.; VEROTTA, L.; CORNARA, L.; BOTTINI-MASSA, E. **Herbal Principles in Cosmetics**. United States of America: Taylor e Francis Group, 2010.

CAFFAL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879-1900, 2009.

CALIXTO, C.P.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. **Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso bruto das folhas de *Arctium lappa* L.(EA)**. In: XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia, 2003, Águas de Lindóia, SBFTE 2003, Resumos, p.187-188.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, p. 531-537, 2008.

CARINI, M.; FACINO, R. M.; ALDINI, G.; CALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 12, p.1813-1919, 1998.

CARPITA, N. C.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Courier, p. 52-108, 2000.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CHAN, Y. S.; CHENG, L. N.; WU, E. C.; KWAN, Y. W.; LEE, S. M. Y.; LEUNG, G. P. H.; YU, P. H. F.; CHAN, S. W. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). **Inflammopharmacology**, v.19, p. 245-254, 2011.

CHEN, F. A.; WU, A. B.; CHEN, C. Y. The influence of treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active. **Food Chemistry**, v. 86, p. 479-484, 2004.

CHEVALIER, A. **The Encyclopedia of Medicinal Plants**. New York: Dorling Kindersley, 1996.

CHO, M. K.; JANG, Y. P.; KIM, S. G. Arctigenin, a pheynilpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF- $\alpha$  inhibition. **International Immunopharmacology**, v. 4, p.1419-1429, 2004.

CHO, M. K.; PARK, J. W.; JANG, Y. P.; KIM, Y. C.; KIM, S. G. Potent inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by dibenzylbutyrolactone lignans through inhibition of I-kappa B alpha phosphorylation and of p65 nuclear translocation in macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 105–116, 2002.

CIPRIANI, T. R. **Polissacarídeos de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) com atividade gastroprotetora**. 95f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v.69, p. 1018–1021, 2006.

CIPRIANI, T. R., MELLINGER, C. G., SOUZA, L. M., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 274–278, 2008.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, M. L. C.; L. M., BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C.A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, p. 687-690, 2009.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CORDEIRO, L. M.C.; REINHARDT, V. F.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; BURCI, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: Structure and gastroprotective activity. **Food Chemistry**, v.130, p. 937-944, 2012.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis no Brasil**. Ministério da Agricultura: Instituto de Desenvolvimento Florestal, v.1, p. 269, 1984.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p.435-442, 1998.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gublenkian, 2003.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1453–1461, 2011.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI C.; DI BENEDETTO R.; GARGIULO R; GIOVANNINI C; MASELLA R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità**, v. 43, p. 348-361, 2007.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DEY, P. M.; BROWNLEADER, M. D.; HARBORNE, J. B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 6-9, 1997.

EICH, E.; PERTZ, H.; KALOGA, M.; SCHULZ, J.; FESEN, M. R.; MAZUMDER, A.; POMMIER, Y. (-)-Arctigenin as a lead structure for inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 86-95, 1996.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, p. 613, 1989.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FERRACANE, R.; GRAZIANI, G.; GALLO, M.; FOGLIANO, V.; RITIANE, A. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa* L.) seeds, root and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 175-181, 2010.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales. El Discórides renovado**. 11 ed. Barcelona: Labor S. A., 1988.

FOSTER, S.; DUKE, J. **A Field Guide to Medicinal Plants and Herbs**. Boston, MA: Houghton Mifflin Harcourt, 1999.

GALATI, E. M.; MONDELLO, M. R.; GIUFFRIDA, D.; DUGO, G.; MICELI, N.; PERGOLIZZI, S.; TAVIANO, M. F. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4903-4908, 2003.

GENTIL, M.; PEREIRA, J. V.; SOUSA, Y. T. C. S.; PIETRO, R.; NETO, M. D. S.; VANSAN, L. P.; FRANÇA, S. C. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 184-186, 2006.

HAMAUZU, Y.; IRIE, M.; KONDO, M.; FUJITA, T. Antiulcerative properties of crude polyphenols and juice of apple, and Chinese quince extracts. **Food Chemistry**, v. 108, p. 488-495, 2008.

ICHIHARA, A.; ODA, K.; NUMATA, Y.; SAKAMURA, S. lappaol A and B, novel lignans from *Arctium Lappa* L. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 3961-3964, 1976.

ICHIHARA, A.; KANAI, S.; NUMATA, Y.; NAKAMURA, Y.; SAKAMURA, S. Structures of lappaol F and H, dilignans from *Arctium lappa* L. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 3035-3038, 1978.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Journal of Chemistry Society, Chemistry Communications**, v. 48, p. 1-70, 1976.

JEELANI, S.; KHUROO, M. A. Triterpenoids from *Arctium lappa*. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2011.

JIANG, M. H.; ZHU, L. A.; JIANG, J. G. Immunoregulatory actions of polysaccharides from chinese herbal medicine. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 14, p. 1367-1402, 2010.

KARDOSOVÁ, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFÖLDI, J.; NOSÁL'OVÁ, G.; FRANOVÁ, S.; HRÍBALOVÁ, V. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. Herkules. **Internacional Journal Biological Macromolecules**, v. 33, p. 135-140, 2003.

KOMALAVILAS, P.; MORT, A. J. The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 261-272, 1989.

KNIPPING, K.; VAN ESCH, E.; WIJERING, S.C.; VAN DER HEIDE, S.; DUBOIS, A. E.; GARSSSEN, J. *In vitro* and *in vivo* anti-allergic effects of *Arctium lappa* L. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, p. 1469-1477, 2008.

LEROUGE, P., O'NEILL, M. A., DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P. Structural characterization of *endo*-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. **Carbohydrate Research**, v. 243, p. 359-371, 1993.

LIN, C. C.; LU, J. M.; YANG, J. J.; CHUANG, S. C.; UJIE, T. Anti-inflammatory and radical scavenge effects of *Arctium lappa*. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 24, p. 127-137, 1996.

LIN, L. Z.; HARNLY, J. M. Identification of hydroxycinnamoylquinic acids of arnica flowers and burdock roots using a standardized LC-DAD-ESI/MS profiling method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10105-10114, 2008.

LIN, S. C.; CHUNG, T. C.; LIN, C. C.; UENG, T. H.; LIN, Y. H.; LINS, Y.; WANG, L. Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride and acetaminophen-induced liver damage. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 28, p. 163-173, 2000.

LIN, S. C.; LIN, C. H.; LIN, C. C.; LIN, Y. H.; CHEN, C. F.; CHEN, I. C.; WANG, L. Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. **Journal of Biomedical Science**, v. 9, p.38-46, 2002.

LIU, C. J.; LIN, J. Y. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on lipopolysaccharide-stimulated macrophages

through modulating pro-/anti-inflammatory cytokines secretion and Bcl-2/Bak protein ratio. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3032-3039, 2012.

LIU, H.; ZHANG, Y.; SUN, Y.; WANG, X.; ZHAI, Y.; SUN, Y.; SUN, S.; YU, A.; ZHANG, H.; WANG, Y. Determination of the major constituents in fruit of *Arctium lappa* L. by matrix solid-phase dispersion extraction coupled with HPLC separation and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 28, p. 2707-2711, 2010.

LIU, S.; CHEN, K.; SCHLIEMAN, D. Isolation and identification of arctiin e arctigenin in leaves of burdock (*Arctium lappa* L.) by polyamide column chromatography in combination with HPLC-ESI/MS. **Phytochemical Analysis**, v.16, p. 86-89, 2005.

LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; ZHANG, M.; GAO, C.; MA, C.; WANG, Z. Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2441–2446, 2010.

MACHADO, F. B.; YAMAMOTO, R. E.; ZANOLI, K.; NOCCHI, C. R. N.; SCHUQUEL, I. T. A.; SAKURAGUI, C. M.; LUFTMANN, H.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Evaluation of the Antiproliferative Activity of the Leaves from *Arctium lappa* by a Bioassay-Guided Fractionation. **Molecules**, v. 17, p. 1852-1859, 2012.

MATSUMOTO, T.; MORIGUCHI, R.; YAMADA, H. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by hydrochloric acid/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 535-539, 1993.

MITSUO, M.; NOBUO, Y.; KATSUYA, T. Inhibitory compounds of alpha glucosidase activity from *Arctium lappa* L. **Journal of Japan Oil Chemists' Society**, v. 54, p. 589–594, 2005.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 266-277, 2008.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. 8 ed. São Paulo: Hemus, 1997.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; FERREIRA, D. M.; DA SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L. GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; PADERIN, N. M.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. **Food Chemistry**, v. 114, p. 610-615, 2009.

PARK, S. Y.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J. S.; LEE, D.; RO, J. S.; HWANG, B. Y. Lignans from *Arctium lappa* and Their Inhibition of LPS-Induced Nitric Oxide Production. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 150-152, 2007.

PEREIRA, J. V.; BERGAMO, D. C. B.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C.; PIETRO, R. C. L. R.; SOUZA, Y. T. C. S. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. **Brazilian Dental Journal**, v. 16, p.192–196, 2005.

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; PUPOVA, G. Y.; VIATYASEV, F. V.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, v. 124, p. 309-315, 2011.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 522-531, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 205-235.

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 271-280, 1998.

RIDLEY, B. L.; O'NEIL, M. A.; MOHNEN, D. **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling**. Phytochemistry, v. 57, p. 929-967, 2001.

RONDANELLI, M.; OPIZZI, A.; MONTEFERRARIO, F. The biological activity of beta-glucans. **Minerva Medica**, v. 100, p. 237-245, 2009.

SANTOS, R. C.; KUSHIMA, H.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L. R. M.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 203-212, 2012.

SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; LEPIESZYNSKI, J.; MAYER, B.; TWARDOWSCHY, A.; MISSAU, F. C.; DOS SANTOS, E. P.; PIZZOLATTI, M. G.;

MARQUES, M. C. A. Gastroprotective activity of the chloroform extract of the roots from *Arctium lappa* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 318-23, 2009.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SCHRÖDER, H. C.; MERZ, H.; STEFFEN, R.; MÜLLER, W. E.; SARIN, P. S.; TRUMM, S.; SCHULZ, J.; EICH, E. Differential in vitro anti- HIV activity of natural lignans. **Zeitschrift für Naturforsch. C**, v. 45, p.1215–1221, 1990.

SCOPARO, C. T.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid–liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion x reversed phase). **Journal of Chromatography A**, v. 1222, p. 29-37, 2012.

SILVA, L. M.; ALLEMAND, A.; MENDES, D. A. G. B.; SANTOS, A. C.; ANDRÉ, E.; SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T. R.; DARTORA, N.; MARQUES, M. C. A.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 179-187, 2013.

SILVA, L. M. **Mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos**. 100f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SILVA JUNIOR, A. A. **Plantas Medicinais**. Itajaí: EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A., 2001.

SILVER, A. A.; KRANTZ J. C. JR. The effect of the ingestion of burdock root on normal and diabetic individuals: a preliminary report. **Annals of Internal Medicine**, v. 5, p. 274-284, 1931.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SLANINA, J.; Taborska, E.; Bochorakova , H.; Slaninova, I.; Humpa, O.; Robinson, W. E. J.; Schram, K. H. New and facile method of preparation of the anti-HIV-1 agent, 1,3-dicaffeoylquinic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 3383–3385, 2001.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, v. 597, p. 86-91, 2008.



SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; SANT'ANA, C. F.; IACOMINI, M. GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. Heart-cutting two-dimensional (size exclusionxreversed phase) liquid chromatography–mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal Chromatography. A**, v. 1216, p. 99-105, 2009.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; SERRATO, R. V.; COSTA, D. E.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal Chromatography. A**, v. 1207, p. 101-109, 2008.

SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SCOPARO, C. T.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; SASSKI, G. L. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7307-7315, 2011.

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipds. **Methods in Enzymology**, v. 35, p. 396-425, 1975.

SRIKANTA, B. M.; SIDDARAJU, M. N.; DHARMESH, S. M. A novel phenol-bound pectic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii* with multi-step ulcer preventive activity. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 5196-5207, 2007.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**. Orlando: Academic Press, p. 97-193, 1983

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2689-2696, 2011.

SUN, X. B.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Antiulcer activity and mode of action of the polysaccharide fraction from the leaves of *Panax ginseng*. **Planta Medica**, v. 58, p. 432-435, 1992.

TAMAYO, C.; RICHARDSON, M. A.; DIAMOND, S.; SKODA, I. The chemistry and biological activity of herbs used in Flor-Essence herbal tonic and Essiac . **Phytotherapy Research**, v. 14, p.1–14, 2000.

TANAKA, L. Y. A.; BRAZ DE OLIVEIRA, A. J.; GONÇALVES, J. E.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; MARQUES, M. C.A.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. An arabinogalactan with antiulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 714-721, 2010.

TAKASUGI, M.; KAWASHIMA, S.; KATSUI, N.; SHIRATA, A. Two polyacetylenic phytoalexins from *Arctium lappa*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2957–2958, 1987.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TOLONEN, A.; JOUTSAMO, T.; MATTILA, S.; KAMARAINEN, T.; JALONEN, J. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and <sup>1</sup>H-NMR methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 316-328, 2002.

VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; PIETERS, L. A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Medica**, v. 64, p. 97-109, 1998.

XU, Z. H.; WANG, X. Y.; ZHOU, M. M.; DENG, Y.; ZHANG, H.; ZHAO, A.; ZHANG, Y.; JIA, W. The antidiabetic activity of total lignan from Fructus Arctii against alloxan-induced diabetes in mice and rats. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 97-101, 2008.

WANG, H.Y.; YANG, J. S. Studies on the chemical constituents of *Arctium lappa* L. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, p. 911-17, 1993.

WANG, B.S.; YEN, G.C.; CHANG, L.W.; YEN, W. J.; DUH, P. H. Protective effects of burdock (*Arctium lappa* Linne) on oxidation of low-density lipoprotein and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 101, p. 729-738, 2007.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 269-276, 1994.

YAMADA, H.; SUN, X. B.; MATSUMOTO, T.; RA, K. S.; HIRANO, M.; KIYOHA, H. Purification of antiulcer polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*. **Planta Medica**, v. 57, p. 555-559, 1991.

ZHAO, F.; WANG, L.; LIU, K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 457-462, 2009.